



HAL
open science

Barrière hémato-encéphalique humaine et endothéline 1 : régulation des transporteurs ABC et des cytokines inflammatoires

Alexandra Hembury

► **To cite this version:**

Alexandra Hembury. Barrière hémato-encéphalique humaine et endothéline 1 : régulation des transporteurs ABC et des cytokines inflammatoires. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT : . tel-00364210

HAL Id: tel-00364210

<https://theses.hal.science/tel-00364210>

Submitted on 25 Feb 2009

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE

ANNÉE 2007 – 2008

SÉRIE DOCTORAT N° 974

THÈSE

Présentée

À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE
FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

par

Mme HEMBURY Alexandra

Titre de la thèse :

**Barrière hémato-encéphalique humaine et endothéline 1 :
régulation des transporteurs ABC et des cytokines inflammatoires.**

soutenue le : 12 Septembre 2008

JURY :

M.	le Docteur GHERSI-EGEA Jean-François	(rapporteur)
M.	le Docteur MOUTHON Marc-André	(rapporteur)
M.	le Professeur FARINOTTI Robert	(Président du Jury)
Mme	le Docteur FERNANDEZ Christine	(examineur)
M.	le Docteur POUIT Bruno	(examineur)
M.	le Docteur MABONDZO Aloïse	(directeur de la thèse)



REMERCIEMENTS

Cette thèse s'est effectuée au :

CEA (Commissariat à l'Energie Atomique)

DSV (Direction des Sciences du Vivant),

iBiTec-S (Institut de Biologie et de Technologies de Saclay),

SPI (Service de Pharmacologie et Immunoanalyse),

LEMM (Laboratoire d'Etudes du Métabolisme des Médicaments).

Je souhaite remercier le Dr Aloïse Mabondzo qui m'a donné l'opportunité de faire cette thèse et qui m'a encadrée durant ces trois années.

Je remercie l'ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le SIDA) de m'avoir financée ainsi que mon projet.

Je remercie les chefs de service successifs, le Dr Jacques Grassi et le Dr Christophe Créminon, ainsi que le chef du LEMM, le Dr Eric Ezan, de m'avoir accueillie au sein de leur structure et laboratoire.

Je remercie le Dr Jean-François Gherzi-Egea et le Dr Marc-André Mouton, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse.

Je remercie le Pr Robert Farinotti, le Dr Christine Fernandez et le Dr Bruno Pouit, d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse et d'être membres du jury.

Je remercie Jean-François Heilier et Gabriel Gras pour, entre autres, leur aide précieuse en statistiques. Je remercie Karine Adel-Patient de m'avoir formée à la technologie du Bio-Plex et de m'avoir conseillée dans l'interprétation des résultats. Je remercie Hervé Volland de m'avoir formée à l'utilisation du microscope à fluorescence, Christophe Tiberghien pour son aide avec la radio-activité, Patricia Lamourette pour son aide en culture cellulaire et Karine Mouchain pour ses conseils concernant l'endothéline 1 et les ELISA.

Je remercie les membres de mon équipe, Eva-Anne Subileau, Céline Declain, Laurence Bousquet, Anne-Cécile Guyot, Stéphanie Lefer et Iva Nesic pour leur soutien, leur amitié et leurs nombreux conseils.

Je remercie l'ensemble des personnes du SPI et de l'équipe de Gabriel Gras pour leurs conseils, leur expertise et leur soutien.

Je remercie mes proches, tout particulièrement mes parents et grand-parents, qui n'ont cessé de m'encourager. Un grand merci à ma mère pour, en plus de tout le reste, ses conseils en orthographe et grammaire.

Enfin, je dédie ce travail à mon mari, Julien Ricouard, qui a supporté ces trois années d'éloignement et de contraintes, qui m'a donné la motivation et les ressources nécessaires pour finaliser ce projet de doctorat.

Chercher à connaître n'est souvent qu'apprendre à douter

Madame Des Houlières (17^{ème} siècle)

TABLE DES MATIERES

<u>LISTE DES ABBREVIATIONS.....</u>	<u>9</u>
<u>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....</u>	<u>11</u>
<u>I- INTRODUCTION.....</u>	<u>14</u>
<u>I- A. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL (SNC).....</u>	<u>16</u>
<u>I-B. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE (BHE).....</u>	<u>17</u>
<u>I-B. 1- LA BHE : UNE SUCCESSION DE STRATES</u>	<u>17</u>
• LES ASTROCYTES.....	18
• LES PERICYTES	19
• LES CELLULES ENDOTHELIALES	19
• LES JONCTIONS SERREES	19
<u>I-B. 2- LES MODES DE PASSAGE POUR TRAVERSER LA BHE</u>	<u>20</u>
<u>I-B. 3- BHE ET PATHOLOGIES</u>	<u>22</u>
<u>I-C. L'INFLAMMATION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL</u>	<u>23</u>
<u>I-C. 1- LES MOLECULES D'ADHESION</u>	<u>25</u>
<u>I-C. 2- LES MMP.....</u>	<u>25</u>
<u>I-C. 3- LES CYTOKINES.....</u>	<u>26</u>
• IL-1.....	26
• IL-6.....	27
• TNFA.....	27
• IL-10.....	27
<u>I-C. 4- LES CHIMIOKINES</u>	<u>27</u>
• MCP-1	28
• IL-8.....	29
<u>I-C. 5- LA BHE ET LA NEURO-INFLAMMATION</u>	<u>29</u>
<u>I-C. 6- NEURO-INFLAMMATION ET PATHOLOGIES</u>	<u>30</u>
<u>I-D. LES PRINCIPAUX TRANSPORTEURS ABC DE LA BHE</u>	<u>33</u>
<u>I-D. 1- LA P-GLYCOPROTEINE.....</u>	<u>35</u>
• LES DIFFERENTS ISOFORMES	35
• SUBSTRATS DE LA PGP	35
• LOCALISATION DE LA PGP.....	35
<u>I-D. 2- LES MRP.....</u>	<u>35</u>
<u>I-D. 3- LA PROTEINE ABCG2 OU BCRP (BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN)</u>	<u>36</u>
<u>I-D. 4- MECANISMES DE REGULATION DES TRANSPORTEURS ABC</u>	<u>37</u>
• REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA PGP.....	37
• AUTRES TYPES DE REGULATION DE LA PGP	38
• REGULATION DES MRP	40
• REGULATION D'ABCG2.....	40
<u>I-D. 5- LES TRANSPORTEURS ABC ET L'INFLAMMATION</u>	<u>40</u>

• LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION REGULANT LES TRANSPORTEURS ABC ET LEUR IMPLICATION DANS L'INFLAMMATION	40
• LA PGP ET L'INFLAMMATION	41
• LES MRP ET L'INFLAMMATION.....	42
• L'ABCG2 ET L'INFLAMMATION	42
I-D. 6- TRANSPORTEURS ABC ET PATHOLOGIES.....	42
<u>I-E. L'ENDOTHELINE 1.....</u>	<u>44</u>
I-E. 1- FONCTION DE L'ENDOTHELINE 1.....	45
I-E. 2- LES RECEPTEURS ET_A ET ET_B DE L'ENDOTHELINE 1.....	45
I-E. 3- REGULATION DE LA VOIE DE L'ENDOTHELINE 1	47
• REGULATION DES PRECURSEURS DE SYNTHÈSE :	47
• REGULATION DES RECEPTEURS ET _A ET ET _B	47
• REGULATION DE LA LIBÉRATION D'ET-1	48
I-E. 4- L'ENDOTHELINE 1, LE CNS ET LA BHE.....	48
I-E. 5- L'ENDOTHELINE 1 ET L'INFLAMMATION.....	49
• EFFET D'ET-1 SUR LES MOLECULES D'ADHESION.....	50
• EFFET DES CYTOKINES SUR ET-1 ET VICE-VERSA	50
• EFFET D'ET-1 SUR LES MMP	51
• DES FACTEURS DE TRANSCRIPTIONS COMMUNS ENTRE ET-1 ET LES MOLECULES DE L'INFLAMMATION	52
• RELATION ENTRE ET-1 ET MCP-1	52
I-E. 6- ENDOTHELINE 1 ET PATHOLOGIES CEREBRALES.....	53
I-E. 7- L'ENDOTHELINE 1 ET LES TRANSPORTEURS ABC	54
<u>II- OBJECTIFS</u>	<u>56</u>
<u>III- MATERIEL ET METHODES</u>	<u>58</u>
<u>III-A. CHOIX DU MODELE D'ETUDE</u>	<u>59</u>
<u>III-B. LE MODELE HUMAIN DE BHE</u>	<u>59</u>
III-B. 1- OBTENTION DES TISSUS ET CELLULES.....	59
III-B. 2- CARACTERISATION DES CELLULES	61
• CARACTERISATION DES CELLULES GLIALES	61
• CARACTERISATION DES CELLULES ENDOTHELIALES	62
• PROTOCOLE DE L'IMMUNO-MARQUAGE POUR VISUALISATION EN MICROSCOPIE A FLUORESCENCE	63
III-B. 3- PRINCIPE ET OBTENTION DES BARRIERES	63
• CO-CULTURE DES CELLULES POUR LE MODELE <i>IN VITRO</i> DE BHE ADULTES :	63
• CO-CULTURE DES CELLULES POUR LE MODELE <i>IN VITRO</i> DE BHE FOETALES :	64
III-B. 4- EVALUATION DE L'INTEGRITE DE LA MONOCOUCHE DE CELLULES ENDOTHELIALES : TEST DE PASSAGE DE SUCROSE.....	64
<u>III-C. EXPOSITION DES CELLULES A L'ET-1 ET AUX ANTAGONISTES.....</u>	<u>66</u>
III-C. 1- CONCENTRATIONS PHYSIOLOGIQUES D'ET-1 CHEZ L'HOMME.....	66
III-C. 2- CHOIX DES CONCENTRATIONS D'ET-1	66

III-C. 3- EXPOSITION DES BHE A L'ET-1.....	67
III-C. 4- ANTAGONISTES DES RECEPTEURS ET_A ET ET_B.....	67
<u>III-D. EVALUATION DE L'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS ABC.....</u>	67
III-D. 1- EVALUATION DE L'EXPRESSION DES ARN EN RT PCR.....	67
III-D. 2- EVALUATION DE L'EXPRESSION PROTEIQUE EN CYTOMETRIE DE FLUX.....	67
• FIXATION ET PERMEABILISATION DES CELLULES :	68
• CELLULES NON PERMEABILISEES :	68
• CYTOMETRIE DE FLUX :	68
<u>III-E. EVALUATION DE LA FONCTIONNALITE DU TRANSPORTEUR PGP :</u>	69
TEST DE PASSAGE DE LA DIGOXINE	69
<u>III-F. QUANTIFICATION DES CYTOKINES SECRETEES</u>	70
<u>III-G. MATERIEL</u>	71
<u>IV- RESULTATS</u>	73
<u>IV-A. LES MODELES <i>IN VITRO</i> DE BHE HUMAINES ADULTES ET FOETALES.....</u>	74
IV-A. 1- LES CELLULES DE LA BHE ADULTE	74
• LES CELLULES ENDOTHELIALES ADULTES	74
• LES CELLULES GLIALES ADULTES	75
IV-A. 2- LES CELLULES DE LA BHE PRE-NATALE	77
• LES CELLULES ENDOTHELIALES FOETALES	77
• LES CELLULES ASTROCYTAIRES FOETALES.....	78
IV-A. 3- L'INTEGRITE DES BHE HUMAINES PRE-NATALES ET ADULTES	79
<u>IV-B. EXPRESSION DES TRANPORTEURS PAR LES CELLULES DE CES BHE HUMAINES</u>	80
IV-B. 1- EXPRESSION DES ARN.....	80
IV-B. 2- EXPRESSION DES PROTEINES	82
<u>IV-C. EFFET DE L'ENDOTHELINE 1 SUR LE MODELE <i>IN VITRO</i> HUMAIN DE BHE.....</u>	82
IV-C. 1- EFFET DE L'ENDOTHELINE 1 SUR LE MODELE PRE-NATAL HUMAIN DE BHE	83
• EFFET DE L'ET-1 SUR L'EXPRESSION DE LA PGP DES BHE FOETALES	83
• EFFET D'ET-1 SUR L'ACTIVITE DE LA PGP DES BHE FOETALES	84
IV-C. 2- EFFET SUR LE MODELE ADULTE HUMAIN DE BHE	85
• EFFET SUR L'EXPRESSION DE LA PGP DES CEMCH	85
• EFFET SUR LA FONCTIONNALITE DE LA PGP.....	87
IV-C. 3- EFFET SUR LES CELLULES GLIALES HUMAINES EN MONOCULTURE	89
• EFFET SUR LES CELLULES GLIALES ADULTES.....	89
IV-C. 4- MECANISMES IMPLIQUES DANS LA MODULATION DE LA PGP PAR L'ET-1 DANS LE MODELE ADULTE DE BHE HUMAINE	90

IV-C. 5- CONCLUSION CONCERNANT L'EFFET D'ET-1 SUR LA PGP	91
<u>IV-E. EFFET DE L'ET-1 SUR LA NEURO-INFLAMMATION</u>	<u>92</u>
IV-E. 1- EFFET D'ET-1 SUR LA SECRETION DE MCP-1 DANS UN MODELE ADULTE DE BHE HUMAINE.....	92
• EFFET SUR LA SECRETION DE MCP-1 EN BASAL	92
• QUEL RECEPTEUR A L'ET-1 EST IMPLIQUE DANS LA SECRETION DE MCP-1 EN BASAL ?.....	93
• SECRETION DE MCP-1 EN APICAL	94
• CONCLUSION CONCERNANT LA SECRETION DE MCP-1	95
IV-E. 2- EFFET D'ET-1 SUR LA SECRETION D'IL-8 DANS UN MODELE ADULTE DE BHE HUMAINE	95
IV-E. 3- EFFET D'ET-1 SUR LA SECRETION D'IL-6 DANS UN MODELE ADULTE DE BHE HUMAINE	96
IV-E. 4- EFFET D'ET-1 SUR LA SECRETION DE MMP.....	97
<u>V- DISCUSSION</u>	<u>98</u>
<u>V-A. COMPARAISON DES MODELES <i>IN VITRO</i> ADULTES ET FCETAUX DE BHE HUMAINES :.....</u>	<u>99</u>
<u>V-B. EFFET DE L'ET-1 SUR L'ACTIVITE DE LA PGP</u>	<u>100</u>
V-B. 1- LES HYPOTHESES DECOULANT DE NOS RESULTATS.....	100
V-B. 2- COMPARAISON DE NOS RESULTATS AVEC CEUX DE LA LITTERATURE	102
V-B. 3- IMPLICATION DES DIFFERENCES D'ACTIVITES DANS LES MODELES ADULTE ET FOETAL	103
<u>V-C. EFFET DE L'ET-1 SUR MCP-1</u>	<u>104</u>
V-C. 1- SECRETION DE MCP-1 EN BASAL.....	104
V-C. 2- SECRETION DE MCP-1 EN APICAL	105
V-C. 3- AUTRES CONSIDERATIONS.....	106
<u>V-D. EFFET D'ET-1 SUR LES AUTRES CYTOKINES</u>	<u>107</u>
V-D. 1- EFFET SUR LA SECRETION D'IL-8	107
V-D. 2- EFFET SUR LA SECRETION D'IL-6	107
<u>VI- CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</u>	<u>108</u>
<u>PUBLICATIONS ET POSTERS</u>	<u>111</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>124</u>

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABCG2	ATP binding cassette sub-family G member 2 (= BCRP)
ADC	Complexe de démence associé au SIDA
ADNc	Acide désoxy-riconucléique complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribo-nucléique
ATP	Adénosine tri-phosphate
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BCRP	Breast cancer resistance protein (= ABCG2)
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BigET-1	Big endothelin 1
CCL2	CC chemokine ligand 2 (= MCP-1= MCAF)
CEMCH	Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines
CGH	Cellules gliales humaines
CD31	Cluster of differentiation 31 (= PECAM)
CD11b	Cluster of differentiation 11b
CD68	Cluster of differentiation 68
ECE	Endothelin converting enzyme
ET-1	Endothéline 1
ET _A	Récepteur à l'endothéline A
ET _B	Récepteur à l'endothéline B
ERK	Extracellular signal related kinase
FRO	Formes réactives de l'oxygène
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
IL-1	Interleukine 1
IL-6	Interleukine 6
IL-8	Interleukine 8
IL-10	Interleukine 10
ICAM	intra-cellular adhesion molecule
IFN γ	Interferon gamma
JAM	Junctional adhesion molecule
JA	Jonction adhérente
JS	Jonction serrée
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LFA	Leukocyte function antigen
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCAF	Macrophage chemoattractant and activatinf factor (= MCP-1 = CCL2)

MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1 (= MCAF = CCL2)
MDR1	Multidrug resistance
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRP	Multidrug resistance protein
NAPDH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NGF	Nerve growth factor
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
NT3	Neurotrophin 3
PECAM	platelet/endothelial cell adhesion molecule (= CD31)
Pgp	P-glycoprotéine
PKC	Protéine kinase C
PPET-1	Prepro-endothelin 1
proET-1	pro endothelin 1
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
SNC	System nerveux central
TGF β	Transforming growth factor beta
TNF	Tumor necrosis factor
Transporteur ABC	ATP binding cassette transporter
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Le plexus arachnoïde, barrière entre le sang et le liquide céphalorachidien (blood-CSF), et la barrière hémato-encéphalique BHE (ou BBB en anglais).	Page 16
Figure 2 : Le réseau micro-vasculaire du cerveau humain adulte.	Page 17
Figure 3 : Coupe transversale d'un vaisseau cérébral.	Page 18
Figure 4 : Immuno-marquage GFAP (glial fibrillary acidic protein) des astrocytes se trouvant autour d'un capillaire.	Page 18
Figure 5 : Représentation schématique d'une coupe de capillaire cérébral et des jonctions adhérentes et serrées présentes entre les cellules endothéliales.	Page 20
Figure 6 : Représentation schématique des différentes modes de passage possible pour un substrat endogène qui traverse la BHE.	Page 21
Figure 7 : L'extravasation leucocytaire et les molécules impliquées dans le passage trans-endothéliale des leucocytes	Page 24
Figure 8 : Les sous familles de chimiokines.	Page 28
Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation structurelle possible des transporteurs ABC.	Page 33
Figure 10 : Les transporteurs ABC de la BHE.	Page 34
Figure 11 : Quelques uns des facteurs modulant la transcription du gène MDR1 codant pour la Pgp.	Page 38
Figure 12 : Schéma bidimensionnel de la partie 5' de l'ARNm de MDR1.	Page 39
Figure 13 : Quelques uns des éléments régulant la Pgp.	Page 39
Figure 14 : Quelques uns des facteurs régulant à la fois l'inflammation et les transporteurs ABC, et PXR régulant les transporteurs ABC et pouvant être régulé par l'inflammation.	Page 41
Figure 15 : Structure des trois isoformes de l'endothéline : ET-1, ET-2 et ET-3.	Page 44
Figure 16 : Quelques exemples des fonctions sur lesquelles agissent les récepteurs ET _A et ET _B .	Page 46
Figure 17 : Exemples de régulation des récepteurs ET _A et ET _B à l'endothéline.	Page 48
Figure 18 : Quelques unes des molécules activées par ET-1 dans les astrocytes.	Page 49
Figure 19 : Quelques exemples des éléments de l'inflammation sur lesquelles agissent les récepteurs ET _A et ET _B .	Page 51
Figure 20 : Régulation de l'activité de la Pgp par l'ET-1 <i>in vitro</i> chez le rat.	Page 55
Figure 21 : Séparation des cellules endothéliales et gliales par gradient de BSA.	Page 60
Figure 22 : Schématisation du modèle <i>in vitro</i> de BHE.	Page 64
Figure 23 : Sélection des éléments qui seront comptabilisés et dont la fluorescence sera évaluée par cytométrie de flux.	Page 68

- Figure 24** : Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines adultes à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à contraste de phases. Page 74
- Figure 25** : Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines adultes à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à fluorescence. Page 75
- Figure 26** : Cellules gliales humaines adultes à des passages précoces (P1 à P3) visualisées au microscope à contraste de phases. Page 75
- Figure 27** : Cellules gliales humaines adultes à des passages précoces (P1 à P3) observées au microscope à fluorescence. Page 76
- Figure 28** : Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines fœtales à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à contraste de phases. Page 77
- Figure 29** : Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines fœtales à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à fluorescence. Page 77
- Figure 30** : Cellules astrocytaires humaines fœtales à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à contraste de phases. Page 78
- Figure 31** : Cellules astrocytaires humaines fœtales à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à fluorescence. Marquage de la GFAP et de SMAA. Page 78
- Figure 32** : Cellules astrocytaires humaines fœtales à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à fluorescence après un immuno-marquage de la Vimentine et de la SMAA. Page 79
- Figure 33** : Evaluation de l'intégrité des monocouches de CEMCH de modèles *in vitro* de BHE adultes et fœtales par le passage de sucrose radio-marqué. Page 79
- Figure 34** : Expression des ARN totaux de cellules endothéliales cérébrales humaines retro-transcrits et amplifiés en RT PCR. Page 81
- Figure 35** : Expression protéique totale de la Pgp, de la MRP1 et de la BCRP (ou ABCG2), évaluée en cytométrie de flux, sur des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines. Page 82
- Figure 36** : Expression protéique totale de la Pgp, observée en cytométrie de flux, dans les CEMCH fœtales et les CGH fœtales d'un modèle *in vitro* humain de BHE exposé à ET-1 durant 24 heures (100 nM, 10 nM et 1 nM). Page 83
- Figure 37** : Effet d'ET-1 sur l'activité de la Pgp des BHE de cellules fœtales. Flux de A vers B et B vers A. Page 84
- Figure 38** : Effet d'ET-1 sur l'activité de la Pgp des BHE de cellules fœtales. Ratios Q. Page 85
- Figure 39** : Expression de la Pgp totale (membranaire et intracellulaire), observée en cytométrie de flux, dans les CEMCH adultes d'un modèle *in vitro* humain de BHE exposé à ET-1 durant 24 heures. Page 86
- Figure 40** : Expression de la Pgp membranaire, observée en cytométrie de flux, dans les CEMCH adultes d'un modèle *in vitro* humain de BHE exposé à ET-1 durant 24 heures (100 nM et 10 nM). Page 87
- Figure 41** : Evaluation de l'activité de la Pgp sur les CEMCH adultes d'un modèle *in vitro* de BHE, via le passage de son substrat spécifique, la digoxine. Page 88

- Figure 42** : Expression protéique totale de la MRP1 et de la BCRP (ou ABCG2) visualisée en cytométrie de flux sur des cellules gliales humaines adultes exposées 24 heures à 100 nM d' ET-1. Page 89
- Figure 43** : Expression protéique totale de la Pgp visualisée en cytométrie de flux sur des cellules gliales humaines adultes exposées 24 heures à différentes concentrations d'ET-1 (100 nM, 10 nM et 1 nM). Page 90
- Figure 44** : Effet d'ET-1 sur l'activité de la Pgp des BHE humaines adultes *in vitro* en présence d'antagonistes aux récepteurs. Page 91
- Figure 45** : Modulation de la concentration de MCP-1 sécrété dans le compartiment basal d'un modèle *in vitro* humain adulte de BHE exposé à ET-1. Page 92
- Figure 46** : Effet des antagonistes aux récepteurs ET_A et ET_B sur la modulation de la sécrétion de MCP-1 dans le compartiment basal de BHE *in vitro* humaines adultes exposées à ET-1. Page 93
- Figure 47** : Effet des antagonistes aux récepteurs ET_A et ET_B sur la modulation de la sécrétion de MCP-1 dans le compartiment apical de BHE *in vitro* humaines adultes exposées à ET-1. Page 94
- Figure 48** : Modulation de la concentration de d'IL-8 sécrétée dans le compartiment apical ou basal d'un modèle *in vitro* humain adulte de BHE exposé à ET-1. Page 95
- Figure 49** : Modulation de la concentration d'IL-6 sécrétée dans le compartiment apical ou basal d'un modèle *in vitro* humain adulte de BHE exposé à ET-1. Page 96
- Figure 50** : Schématisation d'une hypothèse sur le rôle des récepteurs à l'ET-1 dans l'activité de la Pgp des CEMCH adultes d'un modèle *in vitro* de BHE. Page 101
- Figure 51** : Schématisation de certaines hypothèses concernant le mode d'action de l'ET-1 sur les cellules adultes humaines d'un modèle *in vitro* de BHE lors de l'induction de la sécrétion de MCP-1. Page 105
- Figure 52** : L'ET-1, dans un modèle *in vitro* humain adulte de BHE, induit une diminution de l'activité de la Pgp principalement via ET_B, induit une sécrétion de MCP1 via ET_A et ET_B (probablement avec un intermédiaire via ET_A) et induit une sécrétion d'IL-8. Page 109
- Tableau 1** : Liste du matériel utilisé pour les expériences. Pages 71-72

I- INTRODUCTION

La population mondiale vieillit accroissant le nombre de patients atteints de maladies neurologiques. Or, apporter sur le marché un nouveau médicament prend beaucoup de temps (une dizaine d'années) et requiert un investissement pécuniaire important.

L'un des aspects limitants pour les thérapeutiques actuelles dans le domaine de la neurologie est le fonctionnement complexe du système nerveux central, de ses barrières comme la barrière hémato-encéphalique, et des nombreuses molécules impliquées dans les neuro-pathologies ou dans l'accès des médicaments à cet organe (Alavijeh et al., 2005).

Voici quelques unes des raisons qui nous ont poussés à chercher à approfondir nos connaissances sur le lien entre la barrière hémato-encéphalique du système nerveux central, la neuro-inflammation jouant un rôle dans nombre de pathologies, les transporteurs limitant la pénétration des médicaments dans le cerveau, et l'endothéline 1, peptide qui nous semblait pouvoir y jouer un rôle central. Nous apporterons les informations scientifiques utiles sur ces différents composants et composés avant de présenter dans une deuxième partie les résultats de nos travaux. Les données seront ensuite discutées d'une part d'un point de vue des mécanismes mis en jeu et d'autre part en les replaçant dans un contexte bibliographique.

I- A. Le système nerveux central (SNC)

Le système nerveux central (SNC) est un organe sensible et un système suffisamment complexe et important pour que les cellules et neurones qu'il contient soient séparés du sang et du liquide céphalo-rachidien par des structures physico-chimiques qui maintiennent ainsi un environnement ionique stable indispensable à l'activité neuronale. Ces barrières permettent ainsi la régulation de l'équilibre ionique, facilitent le transport des nutriments, et limitent l'entrée de molécules potentiellement dangereuses (Kim et al., 2006). Il y a deux principales barrières au niveau du SNC (figure 1) : la barrière hémato-encéphalique (BHE) et le plexus choroïde et l'épithélium arachnoïde (Abbott, 2004) (voir la figure 1). La barrière hémato-encéphalique a une surface d'approximativement 20 m², ce qui est similaire à la surface de la barrière hémato-liquidienne (entre le sang et le liquide céphalo-rachidien ou LCR). Cependant, la surface de cette dernière est en contact avec le LCR et non le sang, comme c'est le cas pour la BHE (de Boer et Gaillard, 2007).

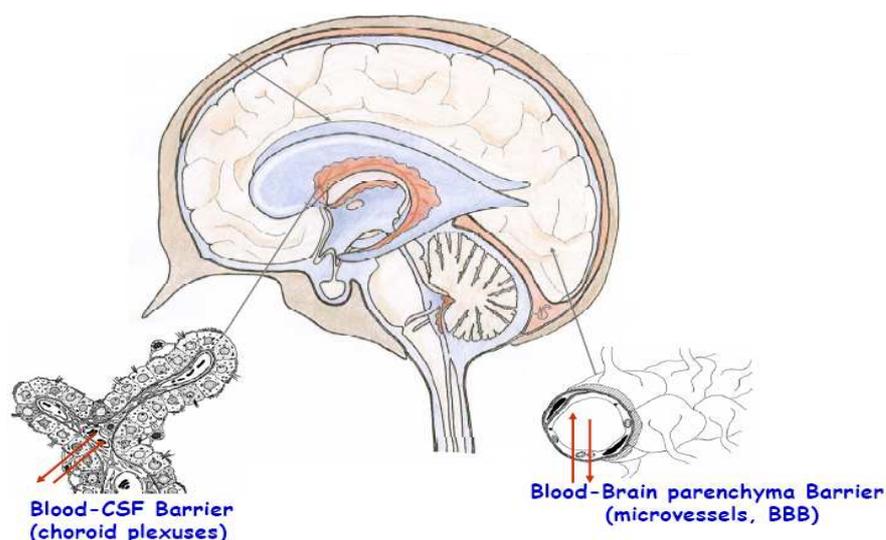


Figure 1 : Le plexus arachnoïde, barrière entre le sang et le liquide céphalorachidien (blood-CSF), et la barrière hémato-encéphalique BHE (ou BBB en anglais). Extrait de (Strazielle et Gherzi-Egea, 2005).

Différents types cellulaires composent le SNC. Les types cellulaires les plus importants en pourcentages sont les neurones et les cellules gliales (Nishiyama et al., 2005). Il y a plusieurs types de cellules gliales. La microglie a un rôle de défense du SNC, ces cellules étant considérées comme des macrophages résidents du SNC (Aloisi, 2001), tandis que les oligodendrocytes sont spécialisés dans la myélination. Les astrocytes ont un rôle trophique, métabolique et de soutien des neurones, mais ils peuvent aussi communiquer avec les cellules environnantes (neurones, vaisseaux sanguins, autres cellules gliales) en créant un réseau de communication, et sont des cellules excitables capables de libérer des glio-transmetteurs. Sous ce terme d'astrocyte se cache en réalité différentes classes cellulaires qu'il est pour l'instant difficile de différencier (Volterra et Meldolesi, 2005).

I-B. La barrière hémato-encéphalique (BHE)

L'existence de la BHE a été révélée par Ehrlich en 1885, lorsqu'il décrit que les tissus cérébraux n'étaient pas colorés lors de l'injection d'un colorant anilique dans la circulation sanguine systémique chez des rats. Puis des observations ont montré que certains composés étaient dénués d'activité pharmaceutique dans le cas d'une injection dans le sang d'animaux expérimentaux, mais produisaient des symptômes dramatiques lors d'injections dans le liquide céphalo-rachidien. Ces expériences suggéraient donc également la présence d'une barrière entre le sang et le cerveau (Bield et Kraus, 1898 ; Lewandowsky, 1900). Un peu plus tard, une autre expérience démontra que du bleu de trypan injecté par voie sanguine colorait tous les tissus à l'exception du cerveau, de la moelle épinière et du liquide céphalorachidien, alors que, lorsque le colorant était injecté dans le liquide céphalo-rachidien, les tissus adjacents du système nerveux central se teintaient, impliquant l'existence d'une barrière au niveau des micro-vaisseaux cérébraux (Goldmann, 1909 ; Goldmann, 1913). Le terme de barrière hémato-encéphalique sera introduit en 1921 par Stern et Gaultier.



Figure 2 : Le réseau micro-vasculaire du cerveau humain adulte. Extrait de (Zlokovic et Apuzzo, 1998).

La BHE chez l'homme se forme à la fin du premier trimestre (Woollett, 2005). Cependant, il semble que ses propriétés définitives ne prennent place qu'à la fin de la période embryonnaire ou au début de la période post-natale (Rubin et Staddon, 1999).

I-B. 1- La BHE : une succession de strates

La BHE est composée principalement de cellules endothéliales, de pieds des prolongements astrocytaires, de la lame basale ou membrane basale et des péricytes (figure 3) (Ballabh et al., 2004).

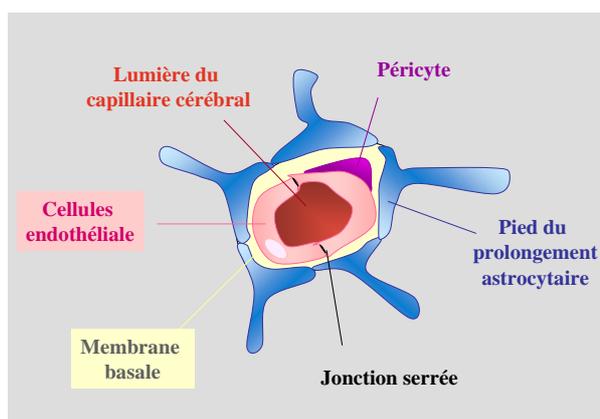


Figure 3: Coupe transversale d'un vaisseau cérébral. D'après (Hawkins et Davis, 2005; Zlokovic et Apuzzo, 1998).

• Les astrocytes

Les astrocytes seraient capables de réguler l'excitabilité neuronale (Fellin et al., 2007), et seraient une source d'énergie pour le cerveau, via la dégradation du glycogène en lactate, lors d'un manque de glucose (Brown et Ransom, 2007). Ils interviendraient également dans la régulation du diamètre des vaisseaux cérébraux (Gordon et al., 2007) et participeraient à la dégradation de la matrice via l'activation des MMP (matrix metalloprotéinases) (Green et Friedland, 2007). De part leur forme et leur situation, étant à la fois proche des neurones et des cellules endothéliales, les astrocytes pourraient être un moyen de communication entre ces deux types cellulaires (Kim et al., 2006).

Ils joueraient également un rôle dans l'immunité et l'inflammation, puisqu'ils peuvent reconnaître le non-soi, promouvoir le recrutement leucocytaire, et réguler la neuro-inflammation (Farina et al., 2007).

Les astrocytes confèreraient aux cellules endothéliales de la BHE leurs propriétés, ou participeraient à ce phénomène (Hawkins et Davis, 2005). Ils semblent en tout cas qu'ils permettent une régulation positive des propriétés de la BHE et notamment le renforcement des jonctions serrées (Abbott et al., 2006). Les cellules endothéliales, réciproquement, ont une influence sur la structure des astrocytes (Persidsky et al., 2006).

Les astrocytes entourent, avec leurs prolongements, les cellules endothéliales et les péricytes (figure 4) (Kacem et al., 1998).

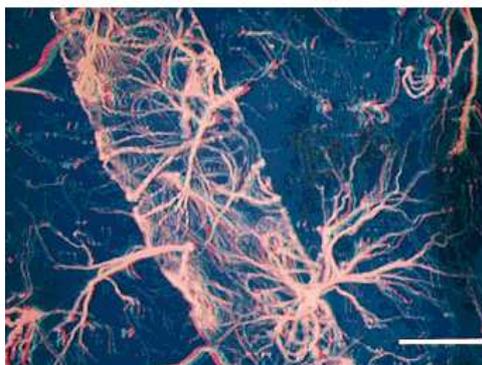


Figure 4 : Immunomarquage GFAP (glial fibrillary acidic protein) des astrocytes se trouvant autour d'un vaisseau sanguin cérébral. La barre blanche représente 50 μ m. Extrait de (Kacem et al., 1998)

- **Les péricytes**

On accorde aux péricytes un rôle proche des cellules astrocytaires. Ils apporteraient un soutien structurel aux cellules endothéliales cérébrales (Ballabh et al., 2004) et pourraient réguler le flux sanguin des capillaires (Bandopadhyay et al., 2001). Les péricytes, qui partagent avec les cellules endothéliales la membrane basale, sont capables d'induire des propriétés de la BHE sur des cellules endothéliales cérébrales en culture (Dohgu et al., 2005; Hayashi et al., 2004; Hori et al., 2004). Récemment, une expérience chez le rat a montré sur un modèle *in vitro* de BHE que la monocouche de cellules cérébrales endothéliales avait une perméabilité plus faible lors d'une coculture à la fois avec des astrocytes et des péricytes que lors d'une coculture avec un seul de ces types cellulaires (Nakagawa et al., 2007).

- **Les cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales de la BHE se distinguent de leurs homologues de la périphérie par un contenu mitochondrial accru (Oldendorf et al., 1977), l'absence de fenestrations (Fenstermacher et al., 1988), une activité pinocytotique minimale (endocytose non spécifique) (Sedlakova et al., 1999), et la présence de jonctions serrées (Kniesel et Wolburg, 2000). Les péricytes sont fixés à la membrane abluminale de l'endothélium à intervalles irréguliers (Tagami et al., 1990). Les péricytes et les cellules endothéliales sont enfermés dans la lame basale, une membrane de 30 à 40 nm d'épaisseur composée de collagène de type IV, de protéoglycanes héparines sulfates, de laminine, fibronectine et d'autres protéines matricielles extracellulaires (Farkas et Luiten, 2001). La lame basale est contiguë à la membrane plasmique des pieds des prolongements astrocytaires. Les astrocytes gagnent le capillaire cérébral (Hawkins et Davis, 2005).

La pénétration des molécules dans le SNC peut se faire au niveau de la BHE par un passage transcellulaire, c'est-à-dire au travers des cellules, ou paracellulaire, soit entre les cellules. Le passage transcellulaire correspond à différents mécanismes comme la diffusion passive de composés lipophiliques, l'utilisation de transporteurs spécialisés ou encore la transcytose. Le passage paracellulaire utilise le gradient de concentrations des ions et solutés. Au niveau de la BHE, le passage paracellulaire est quasiment complètement obstrué par la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales, en apical des membranes (Petty et Lo, 2002). Ces jonctions sont donc un élément déterminant de la bonne 'étanchéité' de la BHE et ainsi de l'environnement adéquate pour le fonctionnement du SNC.

- **Les jonctions serrées**

Il existe plusieurs types de jonctions au niveau de la BHE, se formant entre deux cellules endothéliales adjacentes (figure 5). On trouve les jonctions adhérentes (JA) et les jonctions serrées (JS ou zonula occludens) et peut-être des jonctions gap. Ces dernières, si elles sont présentes, permettent la communication intercellulaire. En revanche, les JS et JA ont pour rôle de limiter la perméabilité de l'endothélium (Hawkins et Davis, 2005).

Les JA sont constituées de protéines cadhérines membranaires qui se lient au cytosquelette d'actine via des molécules intermédiaires, les protéines caténines. Certains composants des JA (comme les caténines) peuvent interagir avec ceux des JS (comme ZO-1) (Ballabh et al., 2004).

Les JA forment une ceinture continue qui permet de maintenir des cellules voisines attachées et qui permet donc le maintien des jonctions serrées (Petty et Lo, 2002).

Une jonction serrée est composée de protéines transmembranaires (occludines, claudines et JAM, junctional adhesion molecules) qui sont reliées au cytosquelette d'actine par les protéines d'ancrage/accessoires (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) (Persidsky et al., 2006).

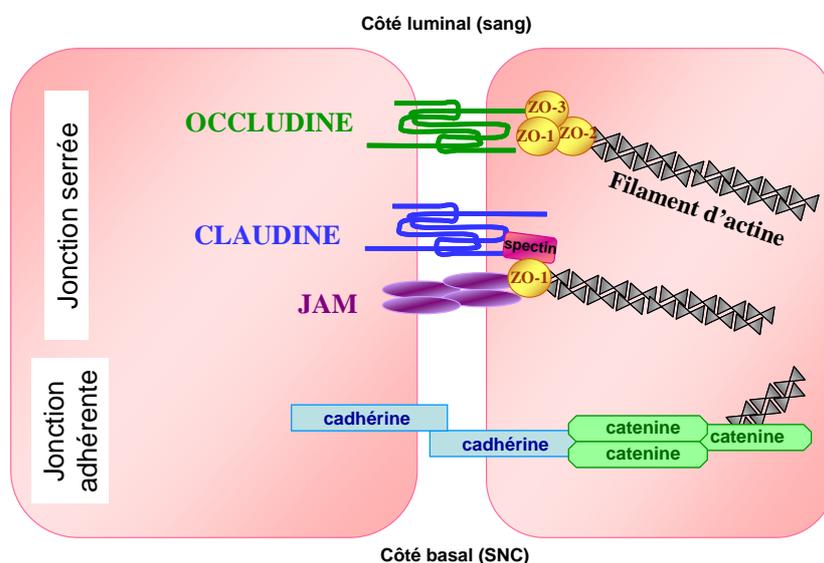


Figure 5 : Représentation schématique d'une coupe de capillaire cérébral et des jonctions adhérentes et serrées présentes entre les cellules endothéliales. D'après (Kim et al., 2006).

Les occludines confèrent aux tissus qui les contiennent une résistance électrique accrue (McCarthy et al., 1996). Les claudines semblent être les acteurs principaux de ces JS puisqu'elles induisent la formation de JS lorsqu'elles sont surexprimées, ce qui n'est pas le cas des occludines (Kubota et al., 1999). Les protéines accessoires sont déterminantes pour la stabilité et la fonction de l'ensemble (Hawkins et Davis, 2005).

Au niveau des JS de l'endothélium cérébral on trouve majoritairement comme protéines la ZO-1, l'occludine et les claudines 3 et 5 (Wolburg et al., 2003).

Les JS peuvent être modifiées par plusieurs facteurs, comme la concentration extracellulaire en calcium, la phosphorylation de certaines des protéines les constituant, ou des conditions pathologiques (Persidsky et al., 2006; Zlokovic et Apuzzo, 1998).

I-B. 2- Les modes de passage pour traverser la BHE

Il existe au sein de la BHE un passage passif des molécules, mais qui est souvent contrecarré par un efflux actif des composés (Seelig, 2007). La diffusion passive dépend de la taille et des propriétés lipophiles des molécules. La BHE possède de nombreuses protéines de transport permettant de réguler le passage des molécules, que ce soient pour l'efflux des xénobiotiques, le

passage de molécules depuis le SNC vers le sang ou le passage depuis le sang vers le SNC (Ohtsuki et Terasaki, 2007).

Le passage des molécules depuis le sang vers le SNC permet d'apporter à l'organe les nutriments et molécules essentielles à son fonctionnement, comme le glucose et les acides aminés (Hawkins et al., 2006; Simpson et al., 2007). Les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) vont eux limiter l'entrée des xénobiotiques (Dallas et al., 2006). D'autres transporteurs permettent d'éliminer les métabolites et toxines depuis le SNC vers le sang (Ohtsuki et Terasaki, 2007).

La transcytose permet également de faire passer des molécules de part et d'autre de la BHE via des vésicules. Il existe une transcytose via des récepteurs, à savoir que la molécule se lie à son récepteur membranaire spécifique ; ce dernier est alors modifié et induit une invagination de la membrane et une vésicule se forme par endocytose puis est conduite de l'autre côté de la BHE où se produit l'exocytose. La transcytose adsorptive est quasi similaire mais ne passe pas par un récepteur. La liaison se fait entre des substances poly-cationiques et les charges négatives de la membrane plasmique ou par la liaison de lectines extracellulaires (Bickel et al., 2001).

Enfin, il existe un passage paracellulaire, notamment pour permettre aux cellules de l'immunité de pénétrer dans le SNC (Wong et al., 2007). Dans ce cadre, des molécules d'adhésion vont venir aider le processus que nous détaillerons davantage dans la partie neuro-inflammation.

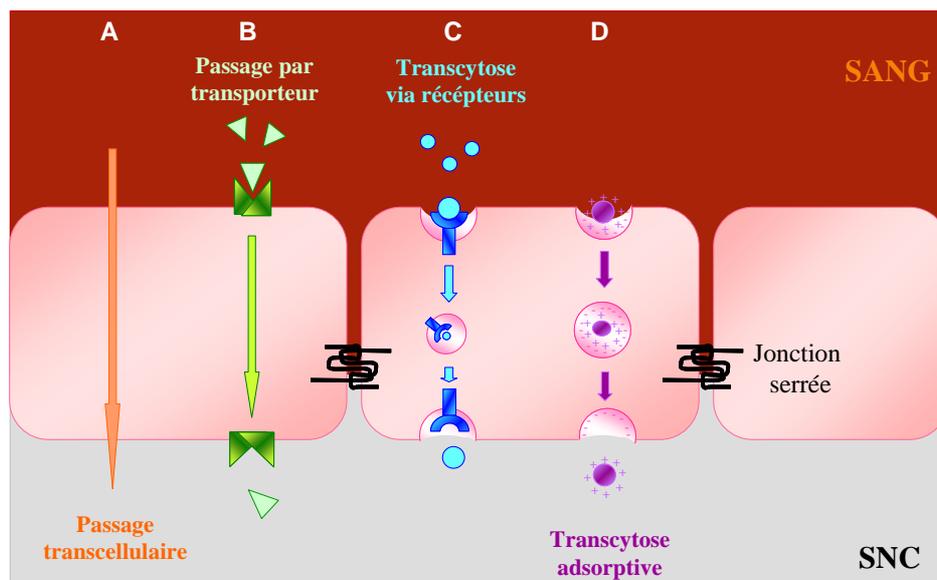


Figure 6 : Représentation schématique des différents modes de passage possible pour un substrat endogène qui traverse la BHE. **A-** les petits substrats lipo-solubles traversent par diffusion passive au travers la membrane (mais ils peuvent être pris en charge par des transporteurs d'efflux) ; **B-** Les petites molécules endogènes comme les acides aminés, les nucléosides et le glucose, sont pris en charge par des protéines de transport pour traverser la BHE ; **C-** Des récepteurs lient des molécules endogènes plus larges, comme l'insuline et la transferrine, et leur font traverser la BHE par endocytose ; **D-** Les larges protéines plasmiques endogènes comme l'albumine, traversent la BHE par endocytose adsorptive. D'après (Deeken et Loscher, 2007).

Les JAM seraient impliquées dans le passage transendothélial (Del Maschio A. et al., 1999) de la BHE, comme dans le cas de la transmigration des monocytes et l'adhésion cellule-cellule qu'elle requiert (Ballabh et al., 2004).

I-B. 3- BHE et pathologies

- La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est un désordre neuro-dégénératif qui se caractérise par un déclin cognitif progressif (perte de mémoire, d'orientation et de raisonnement) (Schindowski et al., 2008) et qui s'accompagne d'une dérégulation neurovasculaire (Girouard et Iadecola, 2006). Sur un plan histologique, au niveau cérébral, il y a accumulation de peptides amyloïdes β sous forme de plaques et de protéines Tau hyperphosphorylées sous forme de noeuds (Schindowski et al., 2008). La BHE a la capacité de produire et de dégrader les peptides β amyloïdes (Crossgrove et al., 2007) et possède des transporteurs capables de prendre en charge ces peptides β amyloïdes. Une dérégulation de ces transporteurs contribuerait à l'accumulation des peptides amyloïdes β (Deane et Zlokovic, 2007).

- Sclérose en plaques

Dans cette maladie chronique, le SNC est envahi par des cellules T et des macrophages qui endommagent la gaine de myéline des axones, conduisant à une perte de fonction et à la mort neuronale (Lucas et al., 2006). Une modulation de la phosphorylation des occludines est observée dans plusieurs pathologies, notamment dans le modèle animal de la multiple sclerosis, où cette altération des JS induirait une augmentation de la perméabilité de la BHE (Morgan et al., 2007).

- Hypoxie et ischémie

L'ischémie cérébrale conduit à une dérégulation du flux sanguin qui induit une augmentation de la perméabilité de la BHE et est associée à une rapide déplétion en nutriments et oxygène (del Zoppo et Hallenbeck, 2000; Petty et Wettstein, 2001). Les jonctions serrées de la BHE auraient un rôle important (Hawkins et Davis, 2005).

- Epilepsie

Cette maladie est une affection neurologique pouvant se manifester par des convulsions, des pertes de conscience et des troubles visuels. Les crises épileptiques seraient associées à une rupture de la BHE (Oby et Janigro, 2006).

- Tumeurs cérébrales

La perméabilité vasculaire serait augmentée avec les tumeurs cérébrales et il y a une altération, dans le sens de la diminution, de l'expression des occludines et claudines des JS (Groothuis et al., 1991; Liebner et al., 2000; Papadopoulos et al., 2001).

- VIH (virus de l'immunodéficience humaine)

Pour pénétrer dans le SNC, le virus peut, entre autre, utiliser les voies paracellulaires de passage de la BHE lorsque des leucocytes qu'il a infectés traversent la barrière (Nottet et al., 1996). Une fois dans le système nerveux central, le virus peut infecter des cellules cibles tels que la microglie et les macrophages, et des cellules dans lesquelles il restera dans un état de latence, sans production, comme les astrocytes (Brack-Werner, 1999). La BHE possédant des transporteurs d'efflux, l'entrée des médicaments dans le SNC est très limitée et confère à cet organe les propriétés d'un sanctuaire viral (de Boer et Gaillard, 2007).

D'autre part, plus tard dans le cours de l'infection, il semble que la rupture de la BHE soit un facteur déterminant dans l'encéphalite associée au VIH (Dallasta et al., 1999).

- L'alcoolisme

Les transports de la BHE sont impliqués dans l'alcoolisme, et seraient perturbés lors de l'addiction (Banks, 1999).

- Neuro-inflammation

Nous parlerons plus en détails de la neuro-inflammation dans le chapitre suivant.

Ainsi, la BHE est un élément clé dans la protection du système nerveux central de par sa faible perméabilité et la présence de transporteurs, mais elle est également impliquée dans de nombreuses pathologies dont la neuro-inflammation.

I-C. L'inflammation du système nerveux central

L'inflammation du SNC se fait non seulement dans des conditions normales de défense contre un organisme extérieur, un agent infectieux ou un dommage des tissus, mais se retrouve également dans le cadre de désordres dégénératifs (accident vasculaire cérébral, épilepsie, sclérose en plaques, maladie des neurones moteurs, maladie d'Alzheimer), voire de maladies psychiatriques (dépression, anxiété et schizophrénie) (Lucas et al., 2006).

Le SNC fut au départ envisagé comme un organe privilégié du système immunitaire dans le sens où l'on pensait à l'époque qu'il y avait une totale absence d'immuno-surveillance de cet organe, en raison des barrières physiques présentes (BHE et barrière épithéliale du liquide céphalo-rachidien –LCR-). Depuis, les scientifiques considèrent qu'il est davantage immuno-spécialisé. Les leucocytes sont capables de pénétrer le SNC sous certaines conditions (Engelhardt et Ransohoff, 2005). L'invasion leucocytaire du SNC est moins rapide que celle d'un autre organe en cas de réponse inflammatoire, cependant l'activation de la microglie et la libération de médiateurs inflammatoires est rapide (Lucas et al., 2006).

Les cellules de la microglie sont considérées comme les macrophages spécialisés du SNC. Elles sont capables de reconnaître le 'non-soi' dans la réponse immunitaire. Les astrocytes sont également importants dans la réponse immunitaire. Ils reconnaissent aussi le 'non-soi' tels les agents infectieux. Lorsqu'ils sont activés, les astrocytes et la microglie participent à l'amplification de l'inflammation via notamment le recrutement leucocytaire (Farina et al., 2007).

La voie d'entrée des leucocytes dans le SNC la plus étudiée est celle du passage au travers de la BHE (Man et al., 2007). Notre modèle d'étude étant la BHE, nous nous pencherons plus précisément sur l'inflammation au niveau de cette structure.

La réponse inflammatoire commence par le recrutement du système immunitaire inné, puis de la réponse adaptative. La réponse innée fait intervenir les phagocytes, les cellules natural killer et les molécules médiant l'inflammation locale, tandis qu'au niveau des cellules résidentes du SNC elle implique la microglie et les astrocytes. La réponse adaptative implique les lymphocytes et les

immunoglobulines (Wyss-Coray et Mucke, 2002). Les leucocytes doivent donc pouvoir traverser la BHE afin d'entrer dans le SNC.

Dans des conditions pathologiques, la microglie et les macrophages dérivés du sang sont activés par les dommages ou l'infection du SNC. Une fois activés, ils migrent sur le site infecté ou endommagé et libèrent des cytokines et facteurs trophiques ayant un effet protecteur ou délétère sur les cellules environnantes (Lucas et al., 2006). Les cytokines et médiateurs pro-inflammatoires jouent un rôle essentiel lors de l'inflammation du SNC puisqu'ils induisent les chimiokines et molécules d'adhésion, et ils recrutent et activent les cellules immunitaires (Rothwell et Luheshi, 2000).

L'extravasation leucocytaire (figure 7) lors de l'inflammation se déroule en plusieurs étapes. Dans des conditions inflammatoires du SNC, il y a induction de l'expression de molécules d'adhésion et de chimiokines au niveau de l'endothélium de la BHE ainsi que de l'épithélium du plexus choroïde, ce qui amplifie le signal de circulation des leucocytes sanguins (Imhof et al., 2001). Dans un premier temps, ce sont les sélectines et leurs ligands qui provoquent une liaison des leucocytes à l'endothélium. Ces liaisons sont suffisamment faibles pour permettre aux leucocytes de continuer leur mouvement (de par le flux sanguin) ce qui entraîne leur roulement sur l'endothélium. Puis les intégrines et leurs ligands engendrent l'arrêt des leucocytes via une adhésion ferme. Les chimiokines jouent notamment un rôle à cette étape en activant les intégrines à la surface des leucocytes. En effet, les chimiokines en se liant à leurs récepteurs conduisent à un regroupement et un changement conformationnel des intégrines ce qui permet une liaison de haute affinité entre les intégrines et leurs ligands. Une fois arrêtés, les leucocytes se meuvent au travers de la surface des cellules endothéliales jusqu'à l'identification des jonctions inter-endothéliales. A ce moment-là, les leucocytes émettent des protubérances à travers les jonctions à la recherche des chimiokines abluminales qui sont les guides de l'extravasation. Les leucocytes arrivent ainsi au niveau de la membrane basale où les MMP (matrix metalloprotease) agissent pour permettre aux leucocytes de poursuivre leur migration via le gradient de chimiokines (Man et al., 2007; Middleton et al., 2002).

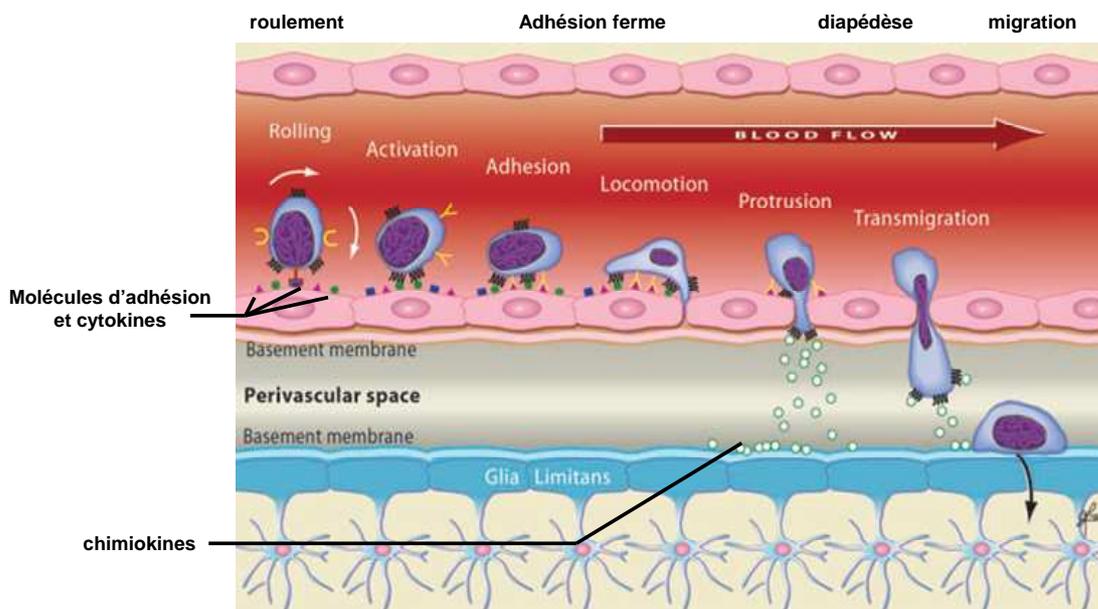


Figure 7 : L'extravasation leucocytaire et les molécules impliquées dans le passage trans-endothéliale des leucocytes. D'après (Huang et al., 2006; Man et al., 2007)

Certaines chimiokines, comme IL-8, peuvent agir sous des formes liées aux membranes. Certaines équipes ont également décrit, en plus du passage para-cellulaire, un passage intercellulaire des leucocytes (Middleton et al., 2002).

I-C. 1- Les molécules d'adhésion

Les molécules d'adhésion sont importantes pour le passage transendothélial des leucocytes (figure 7). Parmi ces molécules citons l'E-selectine, la P-selectine, VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM (inter-cellular adhesion molecule) et PECAM (platelet/endothelial cell adhesion molecule) (Wong et al., 2007).

Les sélectines sont des glycoprotéines permettant des interactions de faible affinité entre les cellules endothéliales et les leucocytes, ce qui entraîne le roulement du leucocyte sur la paroi vasculaire. L'E-sélectine se trouve sur les cellules endothéliales (son ligand, l'oligosaccharide sialyl Lewis X, étant sur les leucocytes), et la P-sélectine sur les cellules endothéliales et les plaquettes (Moore et al., 1994). Les intégrines sont des protéines membranaires hétéro-dimériques qui, lorsqu'elles lient leur ligand, changent de conformation au niveau de leur domaine intracellulaire conduisant à des modifications du cytosquelette cellulaire pour permettre la migration (Okada et al., 1996; Zhang et al., 1994a). Les intégrines sont impliquées dans les interactions cellules-cellules et cellules-matrice (adhésion au collagène ou à la laminine) (Elangbam et al., 1997). Sur les leucocytes se trouve notamment l'intégrine CD11b/CD18 qui a pour ligand ICAM (von Andrian et al., 1991). Cette liaison assure une adhérence plus ferme du leucocyte à l'endothélium (Sobel et al., 1990). La super famille des immunoglobulines comprend ICAM et VCAM, PECAM/CD31, exprimées sur les cellules endothéliales activées. LFA (leukocyte function antigen) est aussi de la famille des immunoglobulines mais est exprimée par les leucocytes (Elangbam et al., 1997).

I-C. 2- Les MMP

Les MMP (Matrix Metalloproteinases) comptent plus de 20 membres qui agissent au niveau extracellulaire, et sont ou non liées à la membrane plasmique. Ce sont des enzymes qui clivent des propeptides (Dzwonek et al., 2004). Les MMP permettent de dégrader par protéolyse la matrice extracellulaire et les protéines, permettant de faciliter l'avancement des leucocytes et contribuant ainsi à l'inflammation (Tsai et al., 2008). Les MMP2 et MMP9 sont les plus étudiées dans le cerveau.

MMP2 (ou gelatinase A), exprimée dans beaucoup de tissus dont l'endothélium mais ayant préférentiellement une origine astrogliale, clive des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène, l'élastine, la fibronectine, et la laminine 5 (Birkedal-Hansen, 1995).

MMP9 est moins présente dans la glie et se trouve surtout au niveau des neurones et pourrait cliver le peptide β amyloïde pour générer un peptide non toxique (Dzwonek et al., 2004). Le niveau de MMP9 augmente dans le LCR dans le cadre de méningite bactérienne. MMP9 est impliquée dans la dégradation du SNC dans des conditions pathologiques (Trysberg et al., 2004). La MMP3 a été identifiée au niveau des neurones et de la microglie activée (Dzwonek et al., 2004).

Les MMP3 et MMP7 pourraient cliver les précurseurs de certaines neurotrophines, ces dernières participant à la survie neuronale et à la plasticité synaptique (Lu et al., 2005).

I-C. 3- Les Cytokines

Plus de 100 cytokines ont été identifiées à ce jour (Rothwell et Luheshi, 2000). Il est difficile d'en donner une définition précise en raison de leur nature variée. Elles ont une taille comprise entre 8 et 26 kDa, sont souvent libérées pour agir localement en modifiant la fonction des tissus, et elles sont plus généralement produites en réponse à une inflammation ou un dommage des tissus (Rothwell et al., 1996).

Les cytokines sont en général classées en deux groupes : les cytokines stimulantes soit pro-inflammatoires, et les inhibitrices, soit anti-inflammatoires (Szelenyi, 2001). Parmi les cytokines pro-inflammatoires se trouvent : interleukine (IL)-1, TNF (tumor necrosis factor), gamma-interferon (IFN γ), IL-12, IL-18 et GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor). Les cytokines anti-inflammatoires comptent parmi leurs rangs : IL-4, IL-10, IL-13, IFN α et TGF β (transforming growth factor beta) (Cavaillon, 2001). A l'état basal dans le cerveau, il y a un équilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires, et ainsi un équilibre entre des signaux neuro-dégénératifs et neuro-protecteurs (Szelenyi, 2001).

Nous détaillerons plus loin le cas des chimiokines, cytokines impliquées dans l'attraction des leucocytes.

Les cytokines ne sont pas seulement impliquées dans la réponse immunitaire. Elles possèdent également des rôles physiologiques et pathologiques (Szelenyi, 2001). Il existe dans le cerveau une expression constitutive des cytokines qui semblent contribuer dans ce cas aux fonctions physiologiques normales du SNC (Pollmacher et al., 2002). Les cytokines, aussi bien au niveau du système nerveux central que du système nerveux périphérique, sont des immunorégulateurs et des neuromodulateurs (Szelenyi, 2001).

Les cytokines agissant dans le SNC sont soit sécrétées par des cellules du SNC soit importées dans le SNC (Muller et Ackenheil, 1998). Par exemple, IL-1, IL-6 et TNF α semblent pouvoir pénétrer la BHE (Banks et al., 1995; Banks et Kastin, 1997; Kastin et al., 1999).

- **IL-1**

Les IL-1 sont non seulement des acteurs de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires), mais elles auraient aussi un rôle neuro-protecteur (Brenneman et al., 1992) et neuro-toxique (Szelenyi, 2001). Elles sont également impliquées dans l'induction de la fièvre, la diminution de l'appétit et du sommeil. Elles sont exprimées par les cellules endogènes du SNC mais à de faibles niveaux dans les cerveaux sains. Lors du processus inflammatoire, ce sont d'abord les microglies qui expriment IL-1 puis les astrocytes. L'oligodendrogliose, les neurones, les cellules vasculaires et les cellules immunitaires circulantes peuvent aussi produire les IL-1 (Rothwell et Luheshi, 2000).

La famille des IL-1 comprend plusieurs membres dont IL-1 β qui, pour être actif, a besoin d'être clivé par une protéase de la famille des capsases (Thornberry et al., 1992).

Des études ont montré que le niveau d'IL-1 était plus élevé au niveau des lésions cérébrales des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, du syndrome de Down (Griffin et al., 1989), de la démence associée au VIH (Zhao et al., 2001) et de la sclérose en plaques (Shaftel et al., 2008). Une augmentation d'IL-1 a été observée dans les échantillons de LCR de patients atteints de la

maladie de Parkinson (Blum-Degen et al., 1995), de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Sharief et al., 1999) ou de sclérose en plaques (Shaftel et al., 2008).

- **IL-6**

Les cytokines de la famille IL-6 sont pro-inflammatoires. Elles sont impliquées dans l'induction de la fièvre (Rothwell et Luheshi, 2000). Elles ont également un rôle neuro-protecteur (Hama et al., 1989). IL-6 stimulerait la production de NGF (nerve growth factor) par les astrocytes et agit également directement en tant que facteur neurotrophique en synergie avec le NGF (Frei et al., 1989). IL-6 peut aussi induire la différenciation neuronale (Satoh et al., 1988). On leur accorde cependant aussi un rôle dégénératif sur les neurones (Gadient et Otten, 1997).

IL-6 est retrouvé dans des quantités élevées dans le LCR de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et dans la maladie de Parkinson (Blum-Degen et al., 1995).

- **TNF α**

TNF α (tumor necrosis factor alpha ou facteur alpha nécrosant des tumeurs) est une cytokine pleiotropique synthétisée par une grande variété de cellules et agissant comme médiateurs de la réponse inflammatoire dans grand nombre de tissus. Dans le SNC, les macrophages résidents ainsi que les astrocytes et la microglie peuvent synthétiser cette cytokine pro-inflammatoire et destructrice de tissus (Lieberman et al., 1989; Righi et al., 1989). Le TNF α peut en effet induire l'apoptose des tissus extraneuronaux ou faciliter la régénération des axones endommagés (Brenneman et al., 1992; Cheng et al., 1994; Schwartz et al., 1991).

La concentration en TNF α dans le LCR, mais non dans le sérum, de patients atteints de la démence vasculaire est plus élevée que chez les patients sains (Tarkowski et al., 2003).

- **IL-10**

IL-10, initialement appelé CSIF (cytokine synthesis inhibitory factor), inhibe la production ou l'activité de cytokines comme IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4 et GM-CSF. Elle inhibe aussi la sécrétion des chimiokines et d'autres molécules impliquées dans le processus inflammatoire. Elle augmente la survie des cellules B et T et promeut l'activité de cellules NK (Pestka et al., 2004). L'effet principal d'IL-10 est de réduire l'inflammation ; cette interleukine limite donc les symptômes de la maladie d'Alzheimer, des méningites, et de la sclérose en plaques (Strle et al., 2001).

I-C. 4- Les Chimiokines

Les chimiokines sont une sous famille des cytokines (Borish et Steinke, 2003). Il existerait une cinquantaine de chimiokines chez l'homme. Elles sont caractérisées par la présence de quatre cystéines en des positions très conservées. Il existe quatre sous-familles de chimiokines (figure 8) (Zlotnik et Yoshie, 2000). La plus grande sous famille est nommée « CC » du fait que ces deux cystéines sont adjacentes. L'autre sous-famille importante s'appelle « CXC » du fait que dans la partie Nterminal de ces protéines, les deux cystéines sont séparées par un seul acide aminé (Rollins, 1997). Deux autres sous-familles plus petites sont à citer. La sous-famille chimiokines C qui ne possède en N-terminal qu'un seul résidu cystéine, et seulement deux résidus cystéines sur les quatre conservés dans les chimiokines (Kelner et al., 1994). La sous-famille CX3C est

caractérisée par la présence de trois acides aminés entre les deux cystéines se situant dans la partie N-terminale de la protéine (Bazan et al., 1997) (Savarin-Vuaillet et Ransohoff, 2007).

La sous-famille CXC comprend, entre autres, IL-8 et IP10. La sous-famille CC compte notamment parmi ses membres MCP1, MIP-1 β et RANTES (Rollins, 1997).

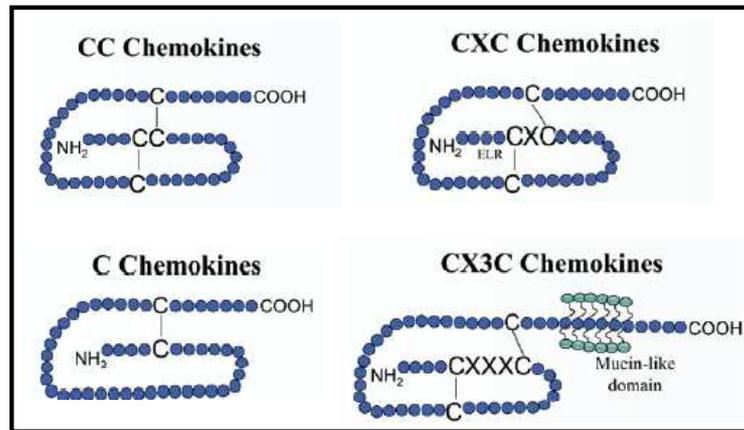


Figure 8 : Les sous-familles de chimiokines. Extrait de (Savarin-Vuaillet et Ransohoff, 2007)

Les chimiokines CC sont capables d'attirer les monocytes, les éosinophiles, les basophiles, les lymphocytes T et les cellules NK (natural killer). Les chimiokines CXC attirent, selon leur spécificité, soit les neutrophiles, soit les lymphocytes et monocytes. Les chimiokines C agissent sur les lymphocytes. Les chimiokines CX3C peuvent être solubles ou membranaires, et ont donc un effet en tant que chemoattractant ou molécule d'adhésion pour agir sur les cellules T, les cellules NK, et les phagocytes mononucléés (Savarin-Vuaillet et Ransohoff, 2007).

Les chimiokines agissent en se liant à des récepteurs couplés à des protéines G (Holmes et al., 1991). Leur nomenclature est corrélée à celle des chimiokines, puisque les premières lettres correspondent à la sous-famille de chimiokines auxquelles ils se lient. Une même chimiokine est capable de se lier à plusieurs récepteurs et un même récepteur peut être activé par différentes chimiokines (Savarin-Vuaillet et Ransohoff, 2007).

• MCP-1

MCP-1 est aussi appelée MCAF (macrophage chemoattractant and activating factor) ou CCL2 (CC chemokine ligand 2) (Matsushima et al., 1989; Yoshimura et al., 1989b).

C'est un puissant chemoattractant qui n'est, dans les conditions normales, pas exprimé à forte concentration dans le SNC. Son augmentation se fait cependant rapidement après un dommage, et ce, surtout au niveau des astrocytes, mais aussi au niveau des macrophages, de la microglie et des neurones (Kuziel et al., 1997; Siebert et al., 2000; Wang et al., 2002). MCP-1 peut être exprimé par différents types cellulaires, dont les monocytes, astrocytes (Andjelkovic et al., 2000), les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (Rollins et al., 1989).

MCP-1 est capable d'attirer sur le lieu de l'inflammation les cellules exprimant le récepteur CCR2 (Kuziel et al., 1997; Siebert et al., 2000; Wang et al., 2002), ce qui comprend entre autres les monocytes, les lymphocytes T, les cellules dendritiques myéloïdes et les cellules NK (Allavena et

al., 1994; Carr et al., 1994; Nakamura et al., 1995; Taub et al., 1995a; Taub et al., 1995b). MCP-1 activerait son récepteur sous la forme d'un dimère (Zhang et Rollins, 1995).

L'expression de MCP-1 dans la plupart des conditions inflammatoires est corrélée à l'infiltration de monocytes sur le site de l'inflammation (Tesch et al., 1999). Les souris déficientes en MCP-1 ou en son récepteur CCR2 sont résistantes à l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, à savoir que les leucocytes ne peuvent pénétrer dans le SNC. Le TNF α joue un rôle critique dans cette maladie en induisant l'expression de MCP-1 par les cellules gliales associées à la BHE (Owens et al., 2005).

MCP-1 joue un rôle aussi bien dans l'immunité innée qu'adaptative. C'est notamment un facteur important pour la différenciation des cellules Th0 en Th2 *in vitro*, via un mécanisme dépendant d'IL-4 (Huang et al., 2001a). *In vitro*, l'attachement des monocytes aux astrocytes (par le biais notamment des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1) conduit à une production de MCP-1 par les deux types cellulaires, cette augmentation de l'expression étant en partie médiée par les cytokines pro inflammatoires IL-1 β et TNF α (Andjelkovic et al., 2000). L'interaction entre les cellules endothéliales et les monocytes conduit également à une augmentation de MCP-1 (ainsi que d'IL-8) qui est indépendante d'une réponse précoce d'IL-1 ou du TNF (Lukacs et al., 1995). Le TNF α module l'expression de MCP-1, et ce, via les formes réactives de l'oxygène (FRO) (Chen et al., 2004). Il semble que MCP-1 lui-même puisse auto-réguler négativement sa synthèse et sa libération au niveau neuro-vasculaire (Ge et al., 2008).

MCP-1 est capable d'induire la production de MMP-9, une protéase impliquée dans les dommages tissulaires (Robinson et al., 2002).

Des travaux rapportent qu'une sur-expression de MCP-1 par les astrocytes empêche l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Elhofy et al., 2005).

- **IL-8**

IL-8 (initialement appelée MDNCF pour monocyte-derived neutrophilic chemotactic factor) est une chimiokine aux puissantes propriétés pro-inflammatoires, agissant principalement sur les neutrophiles (Matsumoto et al., 1997). Elle est fortement régulée et son expression dans les tissus normaux est quasi indétectable (Brat et al., 2005).

IL-8 est capable d'induire la production de MMP2 et MMP9 (Li et al., 2003).

IL-8 aurait aussi un rôle pro-angiogénique et un rôle dans le développement et la progression des tumeurs malignes, notamment au niveau cérébral (Brat et al., 2005; Xie, 2001).

I-C. 5- La BHE et la neuro-inflammation

Les cytokines agissant dans le SNC sont soit sécrétées par des cellules du SNC soit importées dans le SNC (Muller et Ackenheil, 1998). Les cellules endothéliales du cerveau peuvent sécréter, entre autres, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL10, le TNF, la MCP-1 et le TGF β (Fabry et al., 1993; Quan et Banks, 2007). L'IL-1, l'IL-6 et le TNF α semblent pouvoir pénétrer la BHE (Banks et al., 1995; Banks et Kastin, 1997; Kastin et al., 1999). Les cytokines seraient notamment capables de traverser la BHE via deux voies : l'une étant un transport non saturable et non compétitif, l'autre étant celle du transport actif (Quan et Banks, 2007; Watkins et al., 1995).

Si l'on s'attarde plus spécifiquement sur le cas des chimiokines, dans la mesure où elles sont surtout exprimées du côté du SNC, elles doivent pouvoir en partie passer la BHE afin d'attirer les leucocytes le cas échéant. La MCP-1, l'IL-8 et le CXCL12 sont capables d'effectuer ce passage par transcytose (Dar et al., 2005; Ge et al., 2008; Middleton et al., 1997; Mordelet et al., 2007). Certaines chimiokines peuvent aussi en partie utiliser un passage paracellulaire. En effet, la MCP-1 est capable de diminuer l'expression et de rompre l'organisation de ZO-1 et des occludines au niveau des jonctions serrées de la BHE (Song et Pachter, 2004). En marge des passages vers le côté luminal des vaisseaux des chimiokines, il y a aussi une sécrétion de certaines chimiokines par l'endothélium (Middleton et al., 2002).

Les cytokines pro-inflammatoires peuvent donc avoir une action sur la BHE en augmentant sa perméabilité (Blamire et al., 2000). Ainsi, MCP-1, *in vitro* et *in vivo* chez la souris, induit une altération de la perméabilité de la BHE (Stamatovic et al., 2005). Dans un modèle *in vitro* humain de BHE, IL-1 β induit aussi une augmentation de la perméabilité de la BHE (Didier et al., 2003). *In vitro*, IL-8 peut augmenter la perméabilité de la monocouche endothéliale microvasculaire humaines de cellules ne provenant pas du tissu cérébral, probablement en altérant les jonctions serrées (Talavera et al., 2004).

Les MMP, dont la MMP9, semblent pouvoir moduler l'expression des protéines des jonctions serrées, et donc la perméabilité de la BHE (Ishihara et al., 2008).

I-C. 6- Neuro-inflammation et pathologies

Beaucoup de pathologies cérébrales sont associées à l'inflammation. Nous nous attacherons à ne donner quelques détails que sur certaines d'entre elles.

- La maladie d'Alzheimer

Les cerveaux des patients atteints de cette maladie montrent de nombreux signes de la réaction inflammatoire : activation de la glie, expression de molécules associées à l'inflammation tel que le complément (Marx et al., 1998; McGeer et McGeer, 1999). La question du rôle des cytokines dans le développement de la maladie est encore posée puisque les études montrent parfois des résultats contradictoires. L'IL-1 est trouvé en plus grande quantité dans les lésions cérébrales liées à Alzheimer (Griffin et al., 1989), et la concentration en TNF α dans le LCR, mais non dans le sérum, de patients atteints de la maladie d'Alzheimer est plus élevée que chez les patients sains. Ce phénomène n'est pas imputable à une éventuelle déficience de la fonctionnalité de la BHE qui aurait pu permettre l'influx de TNF α (Tarkowski et al., 2003). Cependant, toutes les études sur les patients atteints de la maladie d'Alzheimer n'observent pas cette augmentation du TNF α (Garlind et al., 1999; Lanzrein et al., 1998) ou de l'IL-1. Ainsi, une autre étude ne montra pas de différence lors de la quantification d'IL-1 β et d'IL-6 dans le LCR de patients atteints de la maladie d'Alzheimer comparée à celle chez les patients sains (Tarkowski et al., 2003).

D'autre part, les peptides β -amyloïdes peuvent induire l'expression d'IL-1 β , de TNF α et d'IL-6 par les cellules astrocytaires et microgliales. Cependant, certains scientifiques considèrent également que ce sont les cytokines qui dans un premier temps, lors d'une dérégulation, peuvent entraîner la formation de dégénérescences neurofibrillaires (Rojo et al., 2008). L'IL-1 régule positivement l'expression de la protéine précurseur des β -amyloïdes et stimule le clivage de ce

précurseur en fragments à potentiel amyloïde dans les neurones (Rothwell et Luheshi, 2000). IL-6 également peut réguler l'expression du précurseur amyloïde (Gadient et Otten, 1997). Le TNF α peut, lui, protéger les neurones contre la toxicité engendrée par les β -amyloïdes (Barger et al., 1995).

- La maladie de Parkinson

Cette maladie est caractérisée par la perte de neurones dopaminergiques dans la substance noire. Les symptômes sont, entre autres, une rigidité musculaire et des tremblements ainsi qu'une difficulté à effectuer des mouvements volontaires avec un ralentissement et une diminution de l'ampleur de ces mouvements (Whitton, 2007).

La réaction inflammatoire semble aussi participer à cette maladie. Ici aussi le rôle des cytokines inflammatoires est controversé. Certains montrent que le TNF α et l'IL-1 contribuent à la perte neuronale, tandis que d'autres constatent un effet neuro-protecteur d'IL-1 et d'IL-6. De plus, proche des neurones en dégénérescence de la substance noire a été retrouvée de la microglie activée (Lucas et al., 2006). D'autre part, des médiateurs de l'inflammation sont présents dans le LCR et à côté de la substance noire endommagée des patients atteints (Tansey et al., 2008).

- La maladie de Huntington

La maladie de Huntington est une maladie héréditaire autosomale dominante qui engendre des troubles neuro-dégénératifs, des mouvements involontaires, des modifications de la personnalité et une démence. Dans cette maladie, des niveaux plus élevés dans le sérum de TNF, du récepteur soluble à l'IL-2 et de certaines molécules du complément ont été rapportés (Bonifati et Kishore, 2007).

- La démence associée au SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise)

L'ADC, démence associée au VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine 1), est une complication neurologique grave de l'infection par le VIH-1. Cette démence se manifeste par des dysfonctionnements moteurs, comportementaux et cognitifs (Brabers et Nottet, 2006).

Pour entrer dans le cerveau, et donc traverser la BHE, le VIH-1 utiliserait plusieurs mécanismes dont la transmigration au travers des cellules endothéliales cérébrales via la transcytose, et celui du cheval de Troie, utilisant les cellules immunitaires infectées pour infiltrer le SNC (Kramer-Hammerle et al., 2005). Dans le SNC ce sont principalement la microglie et les macrophages qui produisent le VIH-1 (Anderson et al., 2002; Kaul et al., 2001). Les cellules gliales quiescentes constituent alors un réservoir de VIH-1 qui peut être activé par la suite pour produire du virus dans le SNC (Kramer-Hammerle et al., 2005).

Il semble que MCP-1, qui peut être considéré comme un activateur des macrophages et du chimiotactisme, soit associé à l'ADC. Des cultures d'astrocytes humains produisent MCP-1 de façon dose-dépendante fonction de la protéine virale Tat du VIH-1 mise en présence. La présence de MCP-1 a d'ailleurs été prouvée par la même équipe *in vivo*, dans le LCR et *in situ* dans les tissus cérébraux (Conant et al., 1998). Tat régule également positivement la production d'IL-8 par les cellules endothéliales cérébrales (Hofman et al., 1999). Les chimiokines vont donc amplifier le phénomène d'infection et d'inflammation du SNC. D'autre part, le TNF α et l'IL-1 β jouent également un rôle dans cette pathologie. Leur action neurotoxique a été démontrée (notamment via une production de FRO), bien qu'il semble y avoir une contrepartie neuro-protectrice (Brabers et Nottet, 2006).

- Sclérose en plaques

Beaucoup de médiateurs inflammatoires sont régulés positivement dans cette maladie (Lucas et al., 2006). Cette maladie est associée, entre autres, à une activation inappropriée du réseau de chimiokines. MCP-1 a notamment été retrouvé dans les lésions actives de cette pathologie. Un des meilleurs modèles d'étude animale de cette maladie est l'EAE (encephalomyélite auto-immune expérimentale) (Gerard et Rollins, 2001). Les symptômes cliniques de cette maladie corrèlent avec le niveau de transcription de MMP-7 et MMP-9 (Kieseier et al., 1998).

- La schizophrénie

Plusieurs hypothèses ont été formulées concernant l'origine de cette maladie, comme celle de la maladie infectieuse ou celle de la maladie inflammatoire auto-immune. Il semble que des interleukines de la famille d'IL-1 et qu'IL-6 soit augmentés avec cette pathologie tandis qu'IL-2 diminuerait (Potvin et al., 2008). Une étude montre que les gènes associés à l'inflammation sont régulés positivement dans cette pathologie (Saetre et al., 2007).

- L'épilepsie

On constate dans cette maladie une rupture de la BHE et une élévation des cytokines pro-inflammatoires dans le LCR de patients. Les cytokines conduisent notamment à l'excitabilité des neurones (Choi et Koh, 2008). IL-1 β , entre autres, agit sur l'influx des ions calcium, il inhibe la réabsorption du glutamate par les astrocytes et il augmente la libération du glutamate via la production de TNF α (Beattie et al., 2002; Bezzi et Volterra, 2001; Ye et Sontheimer, 1996). IL-6 semble également impliqué dans cette pathologie (Choi et Koh, 2008).

- AVC et ischémie cérébrale

Le rôle d'IL-1 a été prouvé dans l'ischémie. Le TNF α aurait, lui, à la fois un rôle neurotoxique et neuro-protecteur. IL-6 pourrait également être un acteur de ces pathologies (Lucas et al., 2006).

I-D. Les principaux transporteurs ABC de la BHE

Pour parfaire sa perméabilité limitée et sélective, la BHE dispose, en plus de sa structure physique, de transporteurs d'efflux spécialisés, dont les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Cette super-famille est l'une des plus larges et comprend les protéines qui comptent parmi les plus exprimées. Chez l'homme, 49 gènes ABC sont classés en 7 familles (A à G) (Chang, 2007; Dean et Allikmets, 2001; Klein et al., 1999). La plupart des transporteurs ABC requiert la liaison d'une molécule d'ATP (Adénosine Tri Phosphate) et son hydrolyse pour produire l'énergie nécessaire à la translocation du substrat à travers la membrane cellulaire. Les séquences en acides aminés de ces transporteurs ABC comportent des parties conservées comme le site de liaison à l'ATP incluant une lysine (figure 9), un site d'interaction à Mg^{2+} incluant un acide aspartique, et un motif spécifique à cette superfamille qui est une séquence conservée de 6 acides aminés situés entre les 2 sites précédemment cités (Hung et al., 1998; Sharom et al., 1999; Walker et al., 1982). Ce dernier motif aurait peut-être un rôle dans la reconnaissance, la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (Leslie et al., 2005).

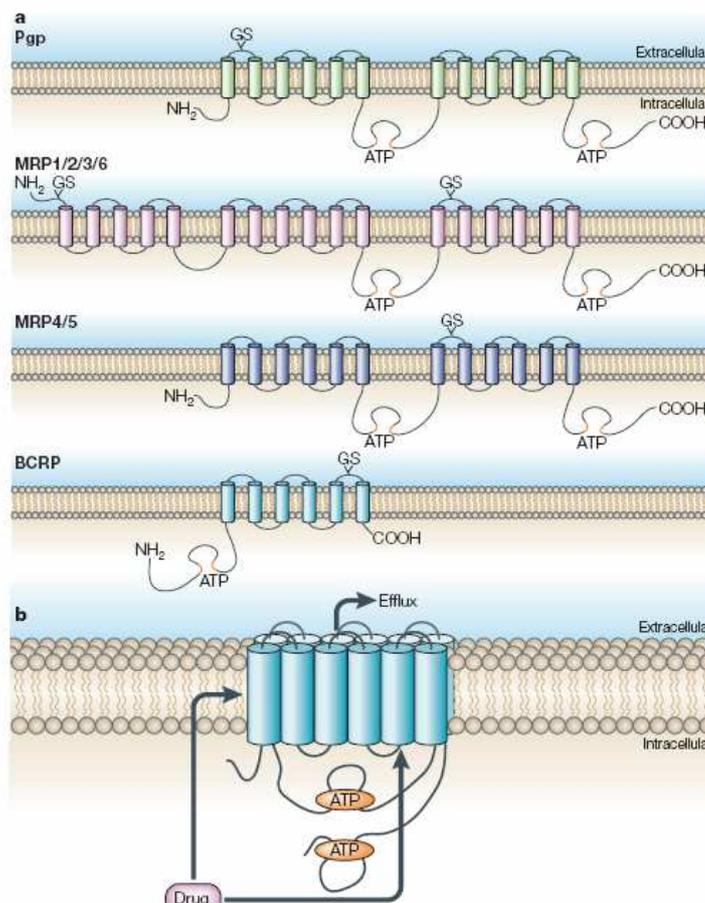


Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation structurale possible des transporteurs ABC. *a/* modèles bidimensionnel de la structure de la Pgp, des MRP et de la BCRP. Le modèle met en évidence les segments transmembranaires, les sites de glycosylation (GS), et les sites de liaison à l'ATP (Adénosine Tri Phosphate). *b/* Il est à préciser que dans la réalité, soit en 3 dimensions, les domaines transmembranaires sont rapprochés pour former une molécule plus compacte comme tente de le montrer la partie b de la figure. Extrait de (Loscher et Potschka, 2005a).

Les transporteurs ABC, d'une manière générale sont impliqués dans le transport des stérols et des acides gras (Borst et al., 2000; Schmitz et Kaminski, 2001) ; ils peuvent avoir des rôles plus spécifiques selon le type cellulaire, comme la P-glycoprotéine qui est impliquée dans le transport des cytokines (IL-2, IL-4 et INF γ) chez les lymphocytes T périphériques normaux (Borst et al., 2000). Surtout ils protègent la cellule et les tissus contre les xénobiotiques (de Lange, 2004).

Ces transporteurs ne sont pas spécifiques de la BHE puisqu'on en retrouve certains au niveau des intestins, du foie, des reins et de la barrière hémato-testiculaire. Ils sont ainsi présents dans les tissus ayant une fonction excrétoire. Les transporteurs ABC comprennent plusieurs familles de transporteurs (figure 9), dont notamment la famille MDR (MultiDrug Resistance) ou ABCB (ATP Binding Cassette sub-family B) qui est la famille de la P-glycoprotéine (Pgp), la famille des MRP (Multidrug Resistance Protein) ou ABCC (ATP Binding Cassette sub-family C) et la BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) ou ABCG2 (ATP Binding Cassette sub-family G member 2). Ces transporteurs sont aussi largement étudiés du fait de leur implication dans la biodisponibilité des médicaments, puisqu'ils sont capables d'effluer ces derniers des tissus (Loscher et Potschka, 2005a; Loscher et Potschka, 2005b).

La Pgp et la BCRP effluent préférentiellement de larges molécules hydrophobes chargées positivement tandis que les transporteurs de la famille MRP préfèrent les molécules hydrophobes non chargées et les composés anioniques solubles dans l'eau (de Lange, 2004).

Les principaux transporteurs exprimés au niveau de la BHE sont (figure 10) : la Pgp (Cordon-Cardo et al., 1989), la MRP1 (Huai-Yun et al., 1998; Regina et al., 1998), MRP2, MRP4, MRP5 (Loscher et Potschka, 2005b) et la BCRP (Cooray et al., 2002). La présence d'ARNm de MRP6 est décelable au niveau de la BHE, ainsi que les ARNm de MRP3 mais en bien moindre quantité (Loscher et Potschka, 2005b).

Ci-après, nous détaillerons davantage les principaux transporteurs, en termes de présence mais aussi d'activité, de la BHE

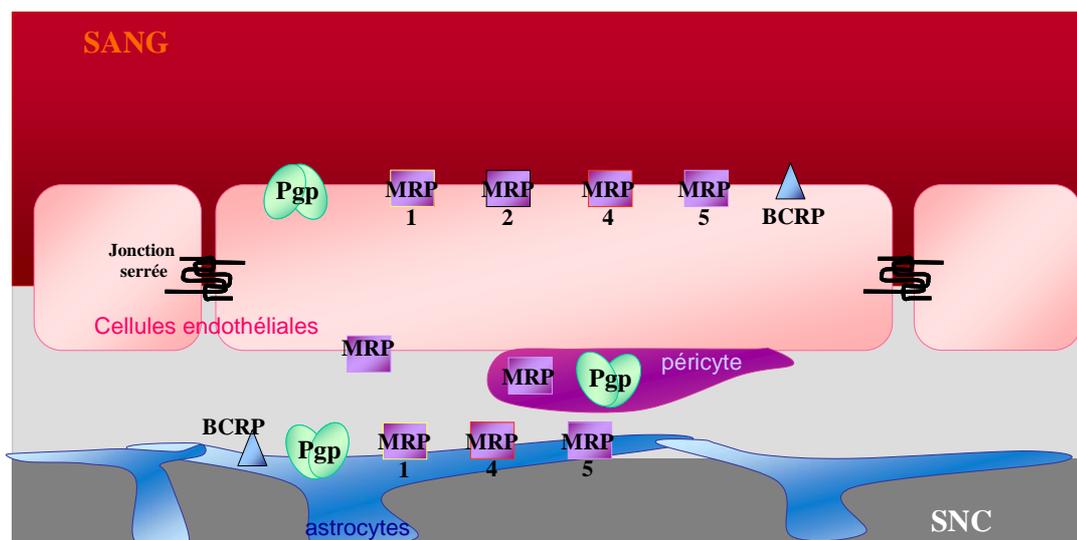


Figure 10 : Les transporteurs ABC de la BHE. D'après (Dallas et al., 2006)

I-D. 1- La P-glycoprotéine

La P-glycoprotéine (Pgp) est une glycoprotéine phosphorylée d'un poids moléculaire apparent de 170 KDa. Elle a été identifiée pour la première fois chez le hamster au sein de cellules tumorales lorsque sa surexpression conféra une résistance multi-drogues. (Juliano et Ling, 1976) La Pgp et ses isoformes ont été trouvés dans de nombreuses espèces dont les insectes, les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères (Bauer et al., 2005).

- **Les différents isoformes**

Chez les rongeurs il existe 3 isoformes de la Pgp : mdr1a, mdr1b et mdr2 (Hsu et al., 1990). Chez l'homme, les isoformes MDR1 et MDR2 ont été identifiés (Chin et al., 1989). Les produits des gènes MDR1 et mdr1 confèrent la résistance multi-drogues (Roninson et al., 1986), tandis que les produits des gènes MDR2 et mdr2 permettent la sécrétion de phosphatidylcholine dans la bile (Smit et al., 1993).

- **Substrats de la Pgp**

La Pgp prend en charge un très grand nombre de substrats dont la masse varie approximativement de 300 à 2000 Daltons. Parmi eux se trouvent des cations organiques, des bases organiques faibles, des anions organiques et des dérivés polypeptidiques. Enormément de médicaments ou substances actives sont également pris en charge par ce transporteur d'efflux : opioïdes, antibiotiques, bloqueurs de canaux à calcium, molécules chimiothérapeutiques, immunosuppresseurs, médicaments contre le VIH... (Bauer et al., 2005)

- **Localisation de la Pgp**

La Pgp est présente au niveau des cellules endothéliales cérébrales humaines (Cordon-Cardo et al., 1989) et de rat (Greenwood, 1992). Elle est localisée sur la face apicale des cellules endothéliales cérébrales humaines de la BHE, alors que dans d'autres tissus elle peut se trouver sur les deux faces (Jette et al., 1993; Stewart et al., 1996). Les cellules endothéliales ne sont pas les seules cellules cérébrales sur lesquelles on localise la Pgp. Cette dernière se trouve également sur les pieds astrocytaires (Pardridge et al., 1997) ainsi que sur les péricytes (Bendayan et al., 2006). De même, la membrane cytoplasmique n'est pas le seul lieu où se trouve le transporteur d'efflux. La Pgp a également été localisée dans le réticulum endo-plasmique (lieu de synthèse protéique) et dans l'appareil de Golgi (lieu de glycosylation des protéines et de leur trafic (Bendayan et al., 2006).

I-D. 2- Les MRP

La famille des MRP comprend 12 membres (Potschka et al., 2003). Nous ne mentionnerons que les transporteurs ayant un intérêt dans l'étude de la BHE.

Le gène de la MRP1 a été cloné pour la première fois chez l'homme en 1992 dans une lignée de cellules cancéreuses qui avait un phénotype de résistance sans pour autant que la Pgp ne soit

exprimée (Cole et al., 1992). Le gène Mrp1 a ensuite été cloné dans différentes espèces dont la souris et le rat (Dallas et al., 2006; Stride et al., 1996; Yang et al., 2002).

La distribution de ce transporteur est large, incluant les épithéliums intestinaux, rénaux, du foie et des poumons (Mayer et al., 1995; Pei et al., 2002; Peng et al., 1999; Scheffer et al., 2002). La MRP1 est aussi présente au niveau des cellules endothéliales cérébrales humaines (Huai-Yun et al., 1998) et de rat (Regina et al., 1998) et seraient aussi sur la microglie (Dallas et al., 2003), les astrocytes (Decleves et al., 2000; Spiegl-Kreinecker et al., 2002) et l'expression d'ARNm a été détectée dans les péricytes (Berezowski et al., 2004).

Il est cependant à noter que les cellules voient leur expression de MRP1 se modifier selon les types cellulaires en présence. Par exemple, des cellules endothéliales cérébrales immortalisées de rat voyaient l'expression de leur MRP1 diminuer lors de leur mise en co-culture avec des astrocytes (Regina et al., 1998).

Chez l'animal, les MRP1 et MRP5 sont localisées sur la face apicale des cellules endothéliales de capillaires cérébraux, tandis que la MRP4 est située sur les 2 faces cellulaires. Ceci diffère des cellules épithéliales où elles se localisent côté apical et baso-latéral (Zhang et al., 2004a). Au niveau de la BHE humaine, les localisations sont les mêmes sauf pour la MRP4 qui ne se trouve que du côté apical. On trouve également les MRP4 et MRP5 sur les astrocytes humains (Nies et al., 2004). La MRP2 est localisée sur la membrane luminale des cellules endothéliales des capillaires cérébraux chez différentes espèces dont l'homme et le rat (Potschka et al., 2003).

MRP1 et MRP2 préfèrent des substrats lipophiliques conjugués à la glutathione, au glucuronate ou au sulfate. La MRP6 peut transporter des conjugués du glutathione ainsi que l'antagoniste au récepteur endothéline BQ123. Les MRP4 et 5 ont, entre autres, pour substrats l'AMP cyclique, le GMP cyclique et les analogues nucléotidiques. La glutathione réduite (GSH) est co-substrat des MRP1, MRP2 et MRP4. A côté de cela, les MRP sont très actives dans l'efflux d'anions organiques à caractère toxicologique (Nies et al., 2004).

Chez l'homme, les MRP4 et MRP5 semblent être les principaux isoformes présents au niveau cérébral (Nies et al., 2004).

I-D. 3- La protéine ABCG2 ou BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)

ABCG2 a d'abord été appelée BCRP puisqu'elle a été découverte dans une lignée de cellules cancéreuses du sein à laquelle elle conférait une résistance non imputable à la Pgp ou aux MRP (Doyle et al., 1998). Ce transporteur a, dans sa structure, beaucoup moins de domaines transmembranaires que la Pgp ou les MRP, et il semble qu'il se présente en dimère (Xu et al., 2004). Les substrats d'ABCG2 sont nombreux et incluent des médicaments, des carcinogènes et des toxines alimentaires (van Herwaarden et Schinkel, 2006).

ABCG2 est localisé surtout du côté luminal des cellules endothéliales de la BHE humaine (Cooray et al., 2002). On trouve également la protéine au niveau des cellules gliales. Cependant, cette expression dans le SNC semble faible et il n'y aurait quasiment pas d'activité liée à ce transporteur dans ce compartiment biologique (Lee et al., 2007).

I-D. 4- Mécanismes de régulation des transporteurs ABC

Nous envisagerons cette question en élargissant le champ des données connues à toutes les cellules humaines étudiées, et non pas simplement celles du SNC.

Les transporteurs ABC sont régulés à différents niveaux et ce par différents type de stimuli. Parmi eux, on trouve les UV, des substances actives et médicaments, les chocs thermiques, des composés endogènes, et des conditions pathologiques dont l'inflammation (Fernandez et al., 2004; Ohga et al., 1998).

Près de la moitié des gènes transcrits par l'ARN Polymérase II contiennent une boîte TATA au niveau du promoteur. Il est intéressant de constater que les gènes des transporteurs de médicaments chez l'homme sont dépourvus de cette boîte TATA à l'endroit attendu et adéquat (bien que le gène codant pour la MRP2 est un élément ressemblant à TATA). Ceci marque une grande différence avec les transporteurs des rongeurs chez lesquels la transcription de ces gènes est TATA dépendante (Scotto, 2003; Stockel et al., 2000). Ainsi, le gène *MDR1* humain codant pour la Pgp possède un élément Inr se substituant à la boîte TATA comme élément initiateur (Cornwell, 1990; Madden et al., 1993).

- **Régulation transcriptionnelle de la Pgp**

Le gène *MDR1* codant pour la Pgp contient en amont de la partie transcrite différents *cis*-éléments sur lesquels peuvent se lier des protéines agissant en *trans* (figure 11) (Labielle et al., 2002).

Comme la plupart des gènes dépourvus de boîte TATA, le promoteur de *MDR1* possède une boîte CCAAT inversée, nommée boîte Y, et des régions riches en GC (Scotto, 2003). La boîte Y interagit avec le facteur de transcription trimérique NF-Y, appelé aussi CBF (Hu et al., 2000), et d'autres études montrent qu'elle interagirait également avec YB-1 bien que cela soit discuté (Labielle et al., 2002). Sur les régions riches en GC viennent se lier les facteurs de transcription de la famille SP (Cornwell et Smith, 1993), notamment Sp1 (Specificity protein 1) qui est activé par la voie des AMPc/PKA (Rohlf et Glazer, 1998). Il semble que les boîtes Y et GC coopèrent, notamment après des irradiations aux UV, et qu'il y ait une interaction physique entre Sp1 et NF-Y pour l'activation du gène humain *MDR1* (Hu et al., 2000; Roder et al., 1999; Sundseth et al., 1997). Chez le rat, Sp1 est aussi un facteur important pour la régulation du gène *mdr2* (Brown et Silverman, 1996).

EGR1 (Early Growth Response factor 1) est un autre facteur pouvant réguler positivement la transcription de *MDR1* (McCoy et al., 1995).

Il se pourrait qu'AP-1 (Activating Protein 1) régule aussi *MDR1*. AP-1 est le terme général pour les complexes de facteurs de transcription homodimériques et hétérodimériques composés des membres des familles oncogènes Fos et Jun (Shaulian et Karin, 2001). Il se trouve que le promoteur de *MDR1* chez l'homme et celui de *mdr1* chez le rongeur seraient susceptibles de contenir des sites de liaison pour AP-1. De plus, les cellules ayant un phénotype de résistance à de multiples substances actives contiendraient un niveau plus important de protéines c-fos et c-jun (Daschner et al., 1999).

Le facteur de transcription C/EBP β (CAAAT/Enhancer Binding Protein- β), aussi nommé NF-IL6 (Nuclear Factor induced by IL-6), induit une régulation positive du gène *MDR1* (Combates et al., 1994).

MEF1, MDR1 Promoter-Enhancing Factor 1, est le facteur régulant positivement l'activité du promoteur de MDR1 dans une lignée de cellules humaines résistantes exprimant fortement la Pgp (Ogretmen et Safa, 2000). MED1 (Multiple start site Element Downstream) est impliqué dans l'expression constitutive de la surexpression de Pgp de cellules résistantes aux composés actifs (Scotto, 2003).

HSF1 (heat-shock transcription factor) a initialement été montré comme régulant l'expression des protéines de choc thermique. Ce facteur est également capable de réguler l'expression du gène *MDR1*, cette régulation pouvant être modulée par des chocs thermiques (Vilaboa et al., 2000).

L'hétérodimère PXR/RXR (Pregnane X Receptor/Retinoid Xenobiotic Receptor) peut activer la transcription de *MDR1* en réponse à différents stimuli xénobiotiques (Geick et al., 2001). Ces récepteurs nucléaires appartiennent à la famille des SXR (Steroid Xenobiotic Receptor) qui régule la voie de clairance des substances actives et qui serait susceptible de coordonner le métabolisme des médicaments via le cytochrome P450, et leur efflux via *MDR1* (Synold et al., 2001). Il est à noter que la présence de PXR dans le cerveau a été démontrée, et qu'au niveau de la BHE, les transporteurs de xénobiotiques sont régulés par ces récepteurs nucléaires (Bauer et al., 2005).

La protéine suppresseur de tumeur p53 pourrait aussi influencer la transcription de MDR1, mais de façon négative (Chin et al., 1992). Parmi les répresseurs de la transcription de MDR1 figure le complexe comprenant NF- κ B et c-Fos (Ogretmen et Safa, 1999).

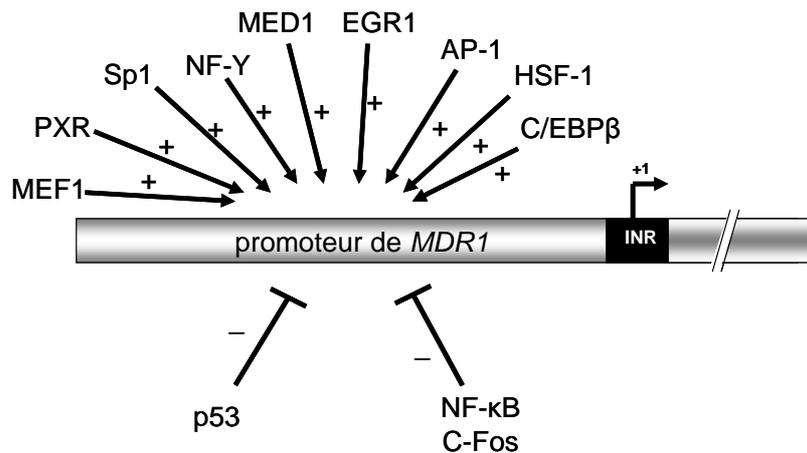


Figure 11 : Quelques uns des facteurs modulant la transcription du gène *MDR1* codant pour la Pgp.

Nous nous rendons ainsi bien compte, étant donné le nombre de facteurs modulant la transcription de MDR1, que la régulation de l'expression de la Pgp est complexe.

- **Autres types de régulation de la Pgp**

L'ARNm *MDR1* est extrêmement structuré dans sa partie 5' non traduite (figure 12). Ces structures secondaires permettent une régulation de la traduction de *MDR1*, peut-être via Akt (Randle et al., 2007).

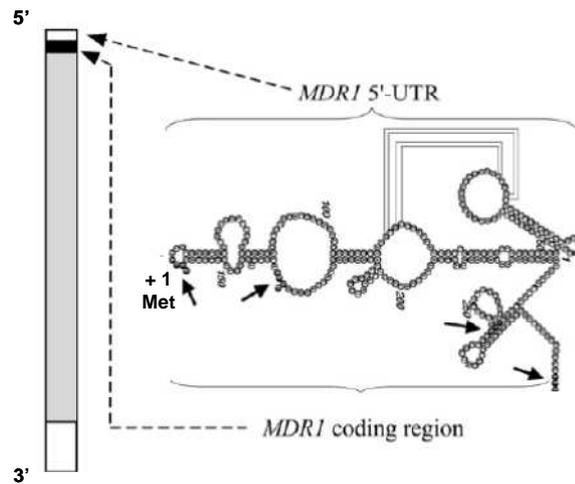


Figure 12 : Schéma bidimensionnel de la partie 5' de l'ARNm de MDR1. Cette partie comprend la région 5' non traduite (5' UTR) et la région codante. Le codon d'initiation de la traduction est situé par le +1 Met, les codons AUG sont localisés par les flèches noires, les chiffres en italique représentant la numérotation des nucléotides. Sur le schéma de gauche, les blocs blancs sont les régions non traduites, le bloc noir la région codante détaillée à droite, et le bloc gris le reste de la région codante. Extrait de (Randle et al., 2007).

Dans le cerveau, une libération de glutamate peut induire une régulation positive de la Pgp au niveau de la BHE (Bankstahl et al., 2008).

La protéine kinase C (PKC), puisque la Pgp est une protéine phosphorylée (Chan et al., 2004), ainsi que l'endothéline 1 (ET-1) régulerait l'activité de transport de la Pgp (Bauer et al., 2007).

Il faut également citer, en termes de régulation, les mouvements intracellulaires de la Pgp. Celle-ci peut être présente au niveau de la membrane cytoplasmique ou bien dans des vésicules intracellulaires (Kipp et al., 2001; Kipp et Arias, 2000).

L'ubiquitination régule aussi la Pgp en influant sur sa stabilité et donc sa dégradation (Zhang et al., 2004b).

Les propriétés de la membrane plasmique sont importantes. Ainsi, la composition en cholestérol et sphingolipides de la membrane, ou de la portion membranaire où se localise la Pgp, a une incidence sur son activité ATPase et son interaction avec les substrats (Dos Santos et al., 2007; Radeva et al., 2005).

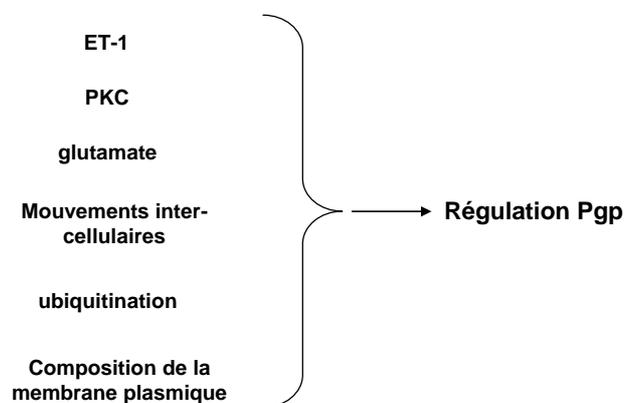


Figure 13 : Quelques uns des éléments régulant la Pgp.

- **Régulation des MRP**

Le promoteur proximal de *MRP2*, dépourvu de boîte TATA, ne possède pas non plus d'élément GC, ni de site Sp1. En revanche, il semble qu'il y ait une boîte CCAAT qui interagirait plutôt avec YB-1 qu'avec NF-Y. Le promoteur du gène *mrp2* chez le rat, possède lui une boîte GC, site pour la fixation de Sp1, ainsi qu'une boîte Y liant NF-Y (Kauffmann et al., 2001; Scotto, 2003).

Sp1 est important dans la régulation du gène MRP1 humain (Zhu et Center, 1996). PXR, un récepteur nucléaire orphelin, régulerait également les gènes codant pour la MRP2 et la MRP3 (Geick et al., 2001; Lehmann et al., 1998).

La voie de signalisation de la PI3K (phosphatidylinositol 3'-kinase) modulerait la MRP1 (Lee, Jr. et al., 2004).

Les MRP pourraient, comme la Pgp, être localisées à différents endroits cellulaires. Le mouvement cellulaire de la MRP2 semble être lié à une glycosylation (Zhang et al., 2005).

- **Régulation d'ABCG2**

Le promoteur d'ABCG2 est également dépourvu de boîte TATA et contient plusieurs sites Sp1 potentiels (Scotto, 2003).

ABCG2 voit également son activité influencée par l'environnement lipidique de la portion membranaire où elle se trouve (Storch et al., 2007).

I-D. 5- Les transporteurs ABC et l'inflammation

- **Les facteurs de transcription régulant les transporteurs ABC et leur implication dans l'inflammation**

Il existe des facteurs de transcription qui sont capables de réguler à la fois des gènes de l'inflammation et les gènes de certains transporteurs ABC (figure 14). Nous citerons ci-après quelques exemples.

Le facteur de transcription EGR1 serait un point convergent de beaucoup de voies de signalisation dont celles impliquées dans l'inflammation et l'apoptose. Les gènes cibles de ce facteur sont par exemple celui du VEGF (vascular endothelial growth factor), d'ICAM1, de protéines classiques présentes lors de l'endommagement d'organes, et donc de *MDR1*. La transcription d'EGR1 serait régulée, entre autres, par NF- κ B, Sp1 et CRE (cAMP Response Element) (McCoy et al., 1995; Ngiam et al., 2007).

Le facteur NF-Y semble aussi impliqué dans l'inflammation. Lors de la mise en culture de monocytes humains, l'activité de NF-Y augmente fortement tout au long de la période pendant laquelle les cellules ne se divisent pas mais subissent une maturation en macrophages fonctionnels avec expression de marqueurs de surface d'activation tels que les antigènes CMH II (Mach et al., 1996; Marziali et al., 1997). La faculté de liaison à l'ADN de NF-Y est influencée par la concentration intracellulaire en calcium (Roy et Lee, 1995).

AP-1 est également impliqué dans l'inflammation. Son activité est modulée par le TNF α et l'IL-1 et a pour cibles des gènes comme celui de la collagénase et de l'IL-2. La réponse à ces cytokines

pro-inflammatoires dépend surtout d'une cascade d'activation des MAPK (mitogen-activated protein kinase), notamment JNK et p38 (Shaulian et Karin, 2001).

L'expression de C/EBP β est régulée positivement par IL-1, IL-6 et TNF dans un cadre inflammatoire (Labialle et al., 2002). D'autre part, C/EBP β contrôle la régulation de diverses cytokines et chimiokines dont IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-12, TNF α et MCP-1 (Bradley et al., 2003). Des travaux montrent que le TNF augmente la quantité d'ARNm de MDR1 ainsi que l'expression de la Pgp dans des cellules endothéliales cérébrales microvasculaires (Yu et al., 2007).

Une revue récente souligne le lien entre certains transporteurs ABC et l'inflammation par l'intermédiaire de PXR, ce dernier régulant les transporteurs et pouvant être induit par l'inflammation afin de réprimer certains gènes (Teng et Piquette-Miller, 2008).

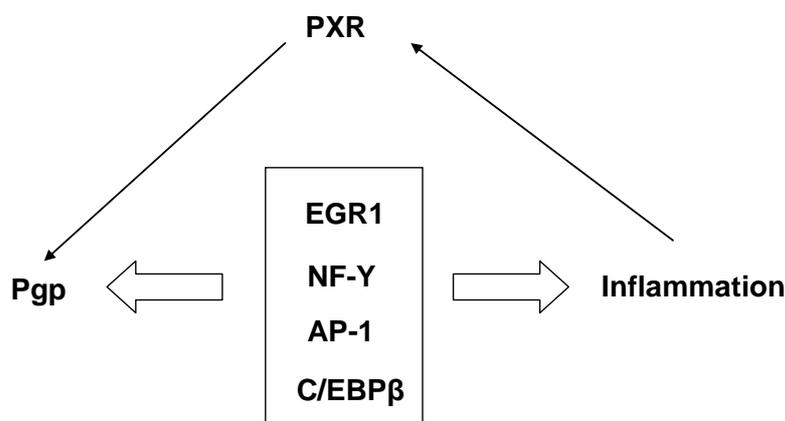


Figure 14 : Quelques uns des facteurs régulant à la fois l'inflammation et les transporteurs ABC, et PXR régulant les transporteurs ABC et pouvant être régulé par l'inflammation.

• La Pgp et l'inflammation

La Pgp a été montrée comme répondant au processus inflammatoire (McRae et al., 2003) et à l'immunomodulation (Richaud-Patin et al., 2004).

Au niveau hépatique, la majorité des études démontrent une régulation négative du gène *mdr1a* au cours de l'inflammation. IL-6 étudiée isolément conduisait à une diminution de l'expression de *MDR1* et *mdr1b* ainsi qu'une diminution de la fonctionnalité de la Pgp. Au niveau intestinal, l'inflammation conduit également à une diminution de l'activité et de l'expression de la Pgp (Fernandez et al., 2004). En revanche, des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, et donc d'inflammation chronique, montrent une surexpression de la Pgp (Llorente et al., 2000).

Au niveau cérébral, l'injection intra-cérébroventriculaire de LPS (Lipopolysaccharide) *in vivo* chez le rat, ce qui provoque un phénomène inflammatoire, induit une diminution de l'activité de la Pgp et de son expression (Goralski et al., 2003). En revanche, *in vitro* chez le rat, au niveau des cellules endothéliales cérébrales, des études montrent des actions contradictoires du TNF α qui peut soit diminuer soit augmenter la fonctionnalité de la Pgp. Il semble que le type de modulation dépende du temps de mise en présence de la cytokine pro-inflammatoire, avec une diminution de l'activité à des temps courts, et une augmentation à des temps plus longs (Bauer et al., 2007; Hartz et al., 2006). L'augmentation de l'activité de la Pgp lors de l'exposition au TNF serait corrélée avec une augmentation de la quantité d'ARNm de MDR1 et de l'expression de la protéine (Yu et al., 2007). Chez des astrocytes de rat, TNF α et IL-1 β induisent une augmentation de l'expression

protéique de la Pgp tandis que IL-6 provoque une diminution de cette expression (Ronaldson et Bendayan, 2006).

Dans des cellules cancéreuses humaines ayant une forte résistance aux médicaments, il a été montré que c'était la production d'IL-6 agissant de façon autocrine qui augmentait l'expression du gène *MDR1* (Conze et al., 2001).

Si les cytokines ont un effet sur la Pgp, l'inverse est également vrai. Il semble que la Pgp soit impliquée dans le transport de cytokines (comme IL-2, IL-4 et IFN γ) au niveau des lymphocytes et dans leur libération (comme IL-2, IL-4, TNF α et IFN γ) au niveau de cellules sanguines mononucléées (Drach et al., 1996; Pawlik et al., 2005).

- **Les MRP et l'inflammation**

Le TNF ne semble pas modifier l'activité de la MRP1 de cellules endothéliales cérébrales de rat (Yu et al., 2007). L'administration de LPS chez le rat est associée à une réduction de la quantité de MRP2 au niveau hépatique (Tang et al., 2000). IL-6 induit l'augmentation des ARNm de MRP1 et MRP3 ainsi qu'une augmentation de leur activité de transport dans des cellules humaines (Lee et Piquette-Miller, 2001). Dans des hépatocytes humains traité avec IL-1 β , les ARNm de MRP2 et MRP3 sont régulés négativement (Le Vee M. et al., 2008).

- **L'ABCG2 et l'inflammation**

Des hépatocytes humains traités avec IL-1 β in vitro voient une régulation négative de l'ARNm d'ABCG2 (Le Vee M. et al., 2008). Chez des patients atteints de colites ulcérales, la phase inflammatoire aiguë entraîne une diminution du niveau d'ARNm d'ABCG2, ceci semblant être corrélé négativement avec le niveau d'ARNm d'IL-6 (Englund et al., 2007).

I-D. 6- Transporteurs ABC et pathologies

Le polymorphisme des gènes codant pour les transporteurs ABC peuvent influencer les pathologies (Marzolini et al., 2004).

Chez les patients épileptiques, l'expression du gène *MDR1* est augmentée dans les tissus cérébraux. La Pgp serait ainsi en partie incriminée dans le cas de patients résistants aux traitements (Tishler et al., 1995), certains médicaments contre l'épilepsie étant pris en charge par les transporteurs ABC. Certaines MRP sont également surexprimées chez les patients épileptiques pharmaco-résistants (Loscher et Potschka, 2005b).

Dans le cadre des tumeurs cérébrales, beaucoup des anticancéreux lipophiles sont substrats des transporteurs ABC (Bart et al., 2000; Kemper et al., 2004). De plus, même lorsque les médicaments arrivent à traverser la BHE, ils sont pris en charge au niveau des tumeurs qui développent des mécanismes de résistance, principalement l'expression de la MRP1 (Dallas et al., 2006). Les patients atteints du VIH développent encore beaucoup de maladies neurologiques même lorsqu'ils sont sous thérapie (Sacktor, 2002). Beaucoup des antirétroviraux sont substrats des transporteurs ABC et confèrent donc une résistance (Dallas et al., 2006).

Beaucoup d'autres médicaments sont substrats des transporteurs d'efflux, notamment la Pgp, comme les médicaments préconisés dans la dépression (Uhr et al., 2000; Uhr et al., 2003), dans la sclérose amyotrophique latérale (Milane et al., 2007), ou dans la maladie d'Alzheimer (Saengkhae et al., 2007). La Pgp a également été incriminée dans la maladie de Parkinson, car la forme sporadique de cette dernière pourrait être liée aux pesticides qui sont, eux, substrats de la Pgp (Lee et Bendayan, 2004).

Un fait intéressant est que la Pgp peut également avoir un effet bénéfique dans certaines neuropathologies, notamment dans la maladie d'Alzheimer où ce transporteur participerait à la limitation de l'accumulation cérébrale des amyloïdes β (Cirrito et al., 2005).

I-E. L'endothéline 1

L'endothéline 1 (ET-1) a été isolée en 1988 par Yanagisawa et al. Il s'agit d'un peptide de 21 acides aminés possédant de ponts disulfures intramoléculaires et qui s'est révélé être un puissant vasoconstricteur et vasodilatateur, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Wright et Fozard, 1988; Yanagisawa et al., 1988). La famille des endothélines comprend 3 membres, ET-1, ET-2 et ET-3, codés par 3 gènes différents, tous les peptides faisant la même taille (Inoue et al., 1989).

Chez l'homme, le précurseur d'ET-1 est la prepro-endothéline 1 (PPET-1) qui a une longueur de légèrement supérieure à 200 acides aminés (212 acides aminés chez l'homme, 203 chez le porc) (Itoh et al., 1988). Un premier clivage donne la pro-endothéline 1 (proET-1), puis un second amène à la big-endothéline 1 (bigET-1) composée d'une quarantaine d'acides aminés (38 chez l'homme, 39 chez le porc et le rat) pour enfin donner, via un dernier clivage, la molécule active biologiquement : ET-1. Les clivages successifs permettent notamment de débarrasser le peptide de ses séquences signal puis des résidus basiques présents dans la partie carboxy-terminale (Kido et al., 1997; Xu et al., 1994). La bigET-1 est un intermédiaire nécessaire à la formation de ET-1 (Fabbrini et al., 1993). L'enzyme responsable de cette dernière étape est l'ECE-1 (Endothelin Converting Enzyme) qui permet un clivage protéolytique inhabituel entre un tryptophane et une valine (Fabbrini et al., 1993; Shimada et al., 1995; Takahashi et al., 1993).

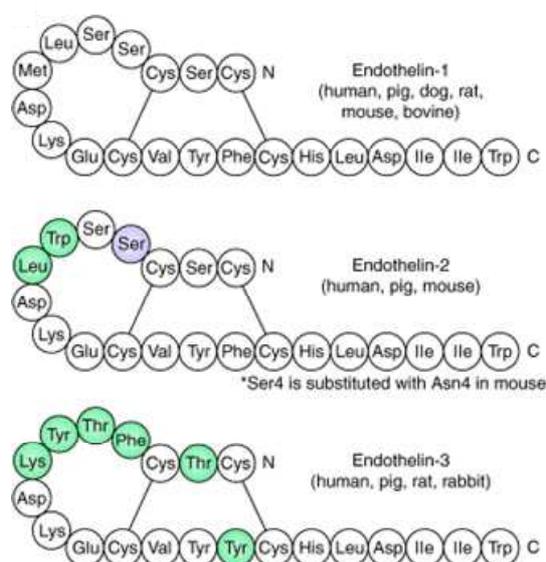


Figure 15 : Structure des trois isoformes de l'endothéline : ET-1, ET-2 et ET-3. Les acides aminés en vert sont ceux qui diffèrent de la séquence d'ET-1. Chez la souris, la sérine (Ser) en position quatre d'ET-2 est remplacée par une asparagine (Asn). N détermine le côté N-terminal et C le carboxy-terminal. Extrait de (Masaki, 2004).

ET-1 est présente dans de très nombreux tissus, mais ce sont surtout les cellules endothéliales qui la produisent (Masaki, 2004). Dans le SNC, ET-1, tant le peptide que l'ARNm, a été identifiée en de nombreuses régions dont les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins cérébraux (Naidoo et al., 2004; Yoshimoto et al., 1990). Il est produit, entre autres, par les cellules endothéliales

(Yanagisawa et al., 1988), les astrocytes (Ehrenreich et al., 1991), les cellules gliales (MacCumber et al., 1990) et par les neurones (Giaid et al., 1989; Lee et al., 1990).

I-E. 1- Fonction de l'endothéline 1

ET-1 est un peptide capable d'agir de façon autocrine et paracrine (Schinelli, 2006; Shichiri et al., 1991) et qui possède un grand nombre de fonctions biologiques.

ET-1 a tout d'abord un rôle dans la **vasoconstriction** et **vasodilatation** (Wright et Fozard, 1988; Yanagisawa et al., 1988).

ET-1 est également un **neuromodulateur** ayant un effet sur l'excitabilité neuronale en modulant la libération de neurotransmetteurs comme la substance P (via une action sur les canaux calcium) (Yoshizawa et al., 1989), la norépinephrine ou encore le neuropeptide Y (Hoang et al., 2002). Au niveau cérébral chez le rat, *in vitro* et *in vivo*, ET-1 permet la libération de glutamate et de dopamine (Webber et al., 1998).

ET-1 a un rôle dans la **nociception**, notamment la douleur inflammatoire, neuropathique et tumorale. Ainsi, au niveau périphérique, ET-1 serait un inducteur de la douleur, alors qu'au niveau du SNC il l'inhiberait via l'hypothalamus (Hans et al., 2008).

ET-1 est impliquée dans la **migration** et l'**invasion** cellulaire, notamment via les molécules d'adhésion et les MMP (Bagnato et al., 2004; Mangahas et al., 2005), dans la **prolifération** cellulaire (Gadea et al., 2008; Gallelli et al., 2005), l'**apoptose** (Okazawa et al., 1998), la **survie cellulaire** (Pflug et al., 2007; Shichiri et al., 1991).

ET-1, sur des cellules humaines provenant du nerf optique, permet une augmentation du collagène de type I et IV par le biais de ses deux récepteurs ET_A et ET_B (Rao et al., 2008).

ET-1 a également un rôle dans l'inflammation comme cela est décrit dans un paragraphe un peu plus loin.

I-E. 2- Les récepteurs ET_A et ET_B de l'endothéline 1

Il existe deux récepteurs aux endothélines, ET_A et ET_B, codés par des gènes différents (Sakurai et al., 1992). Ce sont des récepteurs possédant sept domaines transmembranaires et couplés aux protéines G qui ont différentes affinités pour les différentes endothélines. ET_A a une plus grande affinité pour ET-1 et ET-2 alors qu'ET_B lie de la même façon les trois endothélines (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990). Les deux types de récepteurs sont exprimés par les cellules endothéliales du SNC humain (Zidovetzki et al., 1999), les astrocytes (Schinelli et al., 2001), les péricytes chez le bovin (Takahashi et al., 1989), les cellules de Schwann immortalisées (Wilkins et al., 1997). Dans le cerveau, on trouve majoritairement le récepteur ET_B, ET_A étant situé sur les cellules endothéliales et les vaisseaux cérébraux (van den Buuse M. et Webber, 2000).

La stimulation des récepteurs par l'endothéline conduit à un turnover d'inisitol phosphate, à une mobilisation intracellulaire de calcium, à une activation de PKC, à une inhibition de l'accumulation intracellulaire d'AMPC et à une activation des différentes voies de signalisation dépendant de MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Rubanyi et Polokoff, 1994).

ET_B est impliqué dans la prolifération et l'hypertrophie des astrocytes, l'activation de l'expression du BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) (Koyama et al., 2005b) et de la neurotrophine 3 (Koyama et al., 2005a) dans ces mêmes cellules. Il est également impliqué dans la libération de dopamine (Webber et al., 1998).

ET_B, dans des cultures de cellules hépatiques humaines, semble intervenir dans l'inhibition de la croissance cellulaire dans une voie impliquant l'AMPc et la kinase de c-Jun (Mallat et al., 1996).

ET_B intervient dans la clairance des ET, la libération de NO et prostaglandine, et l'inhibition d'ECE-1 (Hynynen et Khalil, 2006).

ET-1 agit sur le stress oxydatif, la prolifération et l'apoptose par le biais de ET_B, de la NADPH oxydase et Akt (Dong et al., 2005).

Dans la nociception, ET_B peut induire une analgésie ou une réponse de douleur (Hans et al., 2008).

ET-1 agirait de façon paracrine sur les récepteurs ET_A et ET_B des muscles lisses, provoquant la contraction. L'activation d'ET_B des cellules endothéliales stimule la production de prostacycline et d'oxyde nitrique pour permettre la vasodilatation (Pollock, 2005).

ET_A permet la prolifération cellulaire (Hynynen et Khalil, 2006). Dans les cellules épithéliales intestinales de rat, le récepteur ET_A intervient dans l'induction de la croissance cellulaire (Shigematsu et al., 1998).

La survie cellulaire par ET-1 est engagée via ET_A et la voie PI3-kinase/Akt (Pflug et al., 2007).

Dans la nociception, la stimulation de ET_A conduit toujours à la douleur (Hans et al., 2008).

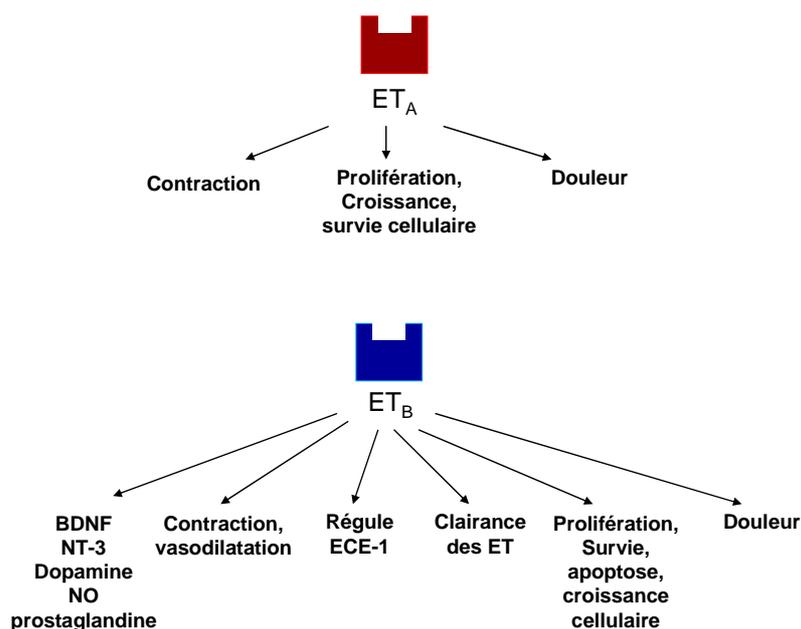


Figure 16: Quelques exemples des fonctions sur lesquelles agissent les récepteurs ET_A et ET_B.

I-E. 3- Régulation de la voie de l'endothéline 1

Plusieurs niveaux de régulation d'ET-1 peuvent être envisagés. Chaque acteur de la voie de synthèse d'ET-1 peut être régulé, cette régulation se répercutant ainsi sur les concentrations d'ET-1 active.

- **Régulation des précurseurs de synthèse :**

L'expression de l'ARNm de PPET-1 peut être modulée positivement par différents éléments dont l'IL-1 β (Yoshizumi et al., 1990) et le TGF β (Kurihara et al., 1989).

Le promoteur de PPET-1 contient un motif GATA, un site de liaison AP1/c-jun et une boîte TATAA. Il semble que le site AP1 permette la régulation par Fos et Jun (Lee et al., 1991).

- **Régulation des récepteurs ETA et ETB**

Dans la transduction des signaux intracellulaires, on trouve les voies de PKC et MAPK (Nilsson et al., 2008). Chez l'homme, il y a trois voies principales distinctes de MAPK permettant la régulation de l'expression des gènes : ERK1/2 (extracellular signal related kinases 1 and 2), JNK (c-jun terminal kinase) et p38 MAPK (Hazzalin et Mahadevan, 2002).

Les récepteurs ET_A et ET_B seraient notamment régulés positivement par la voie de PKC chez le porc et le rat, par la voie ERK1/2, et par la voie JNK (figure 17). La voie PKC est associée au remodelage vasculaire dans l'hypertension, à l'hypertrophie des cardiomyocytes et à la modulation du flux sanguin par le récepteur ET_B chez le rat. La voie ERK semble impliquée dans la croissance cellulaire, dans la régulation positive des récepteurs ET_B contractiles dans des artères cérébrales de rat et dans la modulation du flux sanguin par le récepteur ET_B chez le rat. Enfin, la voie JNK peut être induite par les cytokines inflammatoires, les chocs osmotiques, les UV, et est impliquée dans l'hypertrophie et l'apoptose au niveau cardiaque chez le rat (Nilsson et al., 2008).

D'autre part, l'ET-1 elle-même induit une régulation de ses récepteurs soit en limitant le nombre de sites de liaison vacants soit en induisant une régulation négative (Clozel et al., 1993).

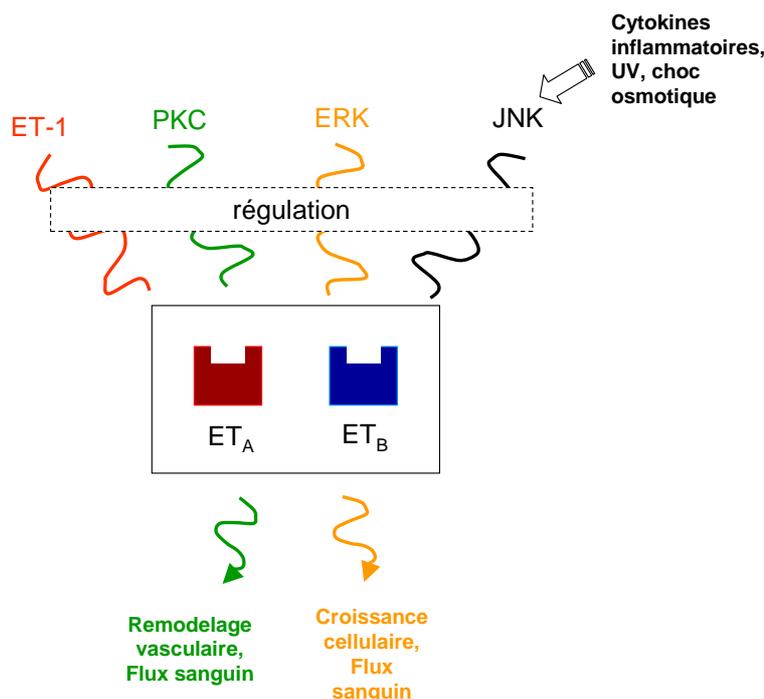


Figure 17: Exemples de régulation des récepteurs ET_A et ET_B à l'endothéline.

• Régulation de la libération d'ET-1

Deux voies de sécrétion sont employées par ET-1. La voie constitutive et la voie régulée. La voie constitutive libère de toutes petites quantités d'ET-1 permettant un équilibre pour l'activité de vasoconstriction/vasodilatation. Différentes conditions peuvent en revanche influencer sur la voie régulée, qui lorsqu'elle est activée, permet la libération de l'ET-1 conservée en intracellulaire (Russell et Davenport, 1999).

Nous verrons un peu plus loin d'autres stimuli pouvant intervenir dans la régulation des voies de signalisation de l'ET-1.

I-E. 4- L'endothéline 1, le CNS et la BHE

Il a été établi qu'ET-1 ne pouvait pas traverser la BHE (Lampf et al., 1997). En revanche, des administrations répétées d'ET-1 chez le rat et le chien provoque une forte augmentation de la perméabilité de la BHE, et ce, via ET_A chez le chien (Narushima et al., 2003). *In vitro*, il a été confirmé qu'ET-1 augmentait la perméabilité de la BHE issue de cellules humaines (Didier et al., 2003). Cependant, chez le rat, des temps courts d'exposition à l'ET-1 n'entraînaient pas d'augmentation de la perméabilité des capillaires cérébraux (Hartz et al., 2004).

Il semble qu'ET-1 soit l'un des médiateurs entre les cellules endothéliales et les péricytes (Dehouck et al., 1997).

Les endothélines sont capables d'inhiber les communications cellulaires entre les astrocytes et ont besoin, pour ce faire, d'un récepteur ET_B fonctionnel (Blomstrand et al., 2004).

Par ailleurs, les astrocytes peuvent réduire la concentration extracellulaire en ET-1 via ET_A et ET_B (Hasselblatt et al., 1998).

ET-1 régule la prolifération et l'activation des astrocytes (figure 18)

Des études ont montré qu'ET-1 activait ERK (extracellular signal-regulated kinase) dans les astrocytes (Cazaubon et al., 1997) et conduisait à la phosphorylation de CREB (cAMP Response Element-binding Kinase) dans les cellules de Schwann (Tabernero et al., 1998) et dans les cellules astrocytaires (Bohm et al., 1995). L'induction de la phosphorylation de CREB dans les astrocytes se ferait par le biais de deux cascades de MAPK, l'une faisant intervenir la voie PKC/ERK, et l'autre la voie p38MAPK (Schinelli et al., 2001). ET-1 augmente la transcription du gène c-fos dans les astrocytes (Ladenheim et al., 1993). De plus, ET-1 peut induire l'activation de Rap1 ce qui induit ensuite l'activation de la kinase B-Raf, événements qui seraient nécessaires à la propagation de la signalisation via ERK (Schinelli et al., 2001). Les astrocytes sont la cible privilégiée d'ET-1 dans le cerveau. ET-1 est capable d'induire la cascade c-Jun dans les astrocytes pour conduire à leur activation (Gadea et al., 2008). Dans ce cadre, ET-1 régulerait les deux composants du complexe AP-1, c-Fos et c-Jun, dans les astrocytes. Les deux voies JNK (c-jun N-terminal protein Kinase) et ERK semblent contribuer à cette activation *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs font l'hypothèse que les voies JNK et ERK conduisent à l'activation de facteurs transcriptionnels tels que c-Fos et c-Jun, puisque c-Jun a notamment été impliqué dans la survie et la prolifération cellulaire (Gadea et al., 2008).

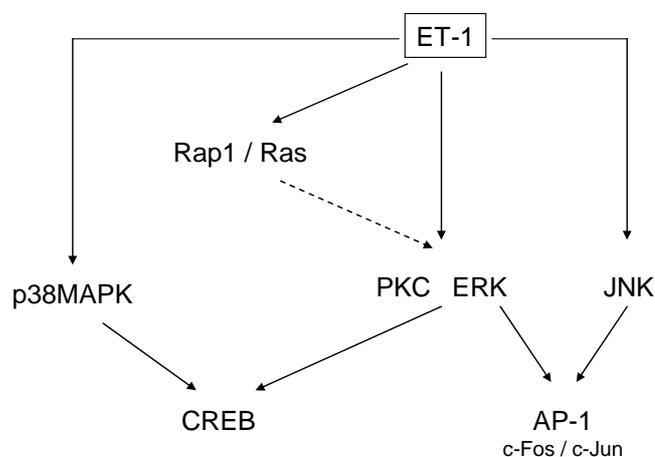


Figure 18 : Quelques unes des molécules activées par ET-1 dans les astrocytes. Pour les références, voir le corps de texte.

I-E. 5- L'endothéline 1 et l'inflammation

Plusieurs études établissent un lien clair entre ET-1 et l'inflammation, que ce soit la réaction inflammatoire en général ou les différentes molécules qui en sont les acteurs.

Ainsi, au niveau gastrique, chez le rat, le niveau d'ET-1, lors de réactions inflammatoires induites par le LPS *in vivo*, est associé à la sévérité de l'inflammation. Il semble que dans ces conditions l'ET-1 participe à limiter l'étendue de la réaction inflammatoire puisque lors de l'inhibition

d'ECE, l'inflammation de la muqueuse gastrique augmentait (Slomiany et Slomiany, 2005). Elle participe également au recrutement et à l'accumulation des leucocytes (Sampaio et al., 2000). L'ET-1 serait sécrétée par les monocytes et macrophages lors de l'infection et de l'inflammation, chez l'homme (Ehrenreich et al., 1990).

Le récepteur ET_A est impliqué dans l'accumulation des leucocytes lors d'une inflammation induite au LPS chez les souris (Sampaio et al., 2004).

Des études semblent indiquer que le récepteur ET_B interviendrait dans la fièvre liée à l'inflammation (Pittman, 2006).

- **Effet d'ET-1 sur les molécules d'adhésion**

Les cellules endothéliales vasculaires cérébrales humaines voient l'expression de leurs molécules d'adhésion augmenter lors d'une exposition à l'ET-1 (McCarron et al., 1993) qui régule ainsi l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales (Zouki et al., 1999).

ET_B est impliqué dans la faculté d'adhésion des monocytes humains (King et al., 1997). Les cellules endothéliales, sur lesquelles se fixent les leucocytes, expriment davantage de VCAM-1, molécule d'adhésion de certains leucocytes, lors d'une stimulation par ET-1, et ce uniquement lorsqu'il y a conjointement une activation par le TNF, TNF et endothéline agissant de façon synergique. Cette augmentation de l'expression de VCAM est attribuée au récepteur ET_B (Ishizuka et al., 1999).

L'ET-1 est capable de promouvoir l'agrégation et de réguler positivement l'expression des intégrines CD11b/CD18 des neutrophiles, cellules qui sont pourvues de récepteurs ET_A (Gomez-Garre et al., 1992; Lopez et al., 1993; Lopez-Farre et al., 1995; Zouki et al., 1999).

- **Effet des cytokines sur ET-1 et vice-versa**

In vitro, IL-8 induit la production d'ET-1 par des cellules endothéliales humaines du cordon ombilical (Cheng et al., 2008), et ET-1 induit la production d'IL-8 par des cellules endothéliales cérébrales humaines (Zidovetzki et al., 1999).

Les cytokines IL-1 β (Yoshizumi et al., 1990) et TGF β (Kurihara et al., 1989) peuvent favoriser l'expression des ARNm codant pour ET-1, et le TNF α augmente l'expression en ARNm et en protéine d'ET-1 dans un modèle humain de BHE (Didier et al., 2003; Marsden et Brenner, 1992). A l'inverse, l'ET-1 peut conduire à la sécrétion de cytokines. Ainsi, l'ET-1 induit la sécrétion d'IL1 β chez les astrocytes (Didier et al., 2003), et la sécrétion de CXCL1 et CXCL8 (IL-8), des chimiokines importantes dans le recrutement des neutrophiles sur le site de l'inflammation (Kobayashi, 2008), via le récepteur ET_B dans des cellules humaines de mélanomes (Mangahas et al., 2005). Le récepteur ET_A intervient lui dans l'augmentation, par des cellules cérébrales endothéliales humaines, de la sécrétion d'IL-8 lors d'une exposition à l'ET-1, et ce, via PKC et NF- κ B (Zidovetzki et al., 1999). Des fibroblastes humains exposés à ET-1 libéraient de l'IL-11 en faisant intervenir le récepteur ET_A et comme voie des MAPK celle de p38/JNK/ERK. Ces mêmes fibroblastes sécrétaient également IL-6 par le biais du récepteur ET_A, mais ce via une cascade différente de phosphorylation (Gallelli et al., 2005). Les cellules musculaires lisses humaines (Browatzki et al., 2000; Marsden et Brenner, 1992) et des cellules endothéliales humaines (Stankova et al., 1996) sécrètent également de l'IL-6 après stimulation par l'ET-1. Dans un modèle animal de rejet d'allogreffe cardiaque, un blocage du récepteur ET_A modifie les taux

circulant en TNF α et IL-1ra (antagoniste endogène du récepteur à l'IL-1), ainsi que l'expression des gènes codant pour IL-10, IL-6 et IL-1ra (Lattmann et al., 2005; Marsden et Brenner, 1992). Des macrophages de souris et des cellules microgiales exposés à différentes endothélines voient leur production de cytokines telles que IL-1 et IL-6 stimulée (Speciale et al., 1998).

L'IL-2 amène à la production d'ET-1 par des cellules épithéliales intestinales de rat, ET-1 intervenant alors via son récepteur ET_A dans la croissance cellulaire (Shigematsu et al., 1998). Une diminution d'IL-4 provoquée par l'ingestion chronique d'alcool chez le rat, conduirait à une augmentation de la production d'ET-1 et de TNF α dans le cadre de l'ulcère de la muqueuse buccale (Slomiany et al., 1999).

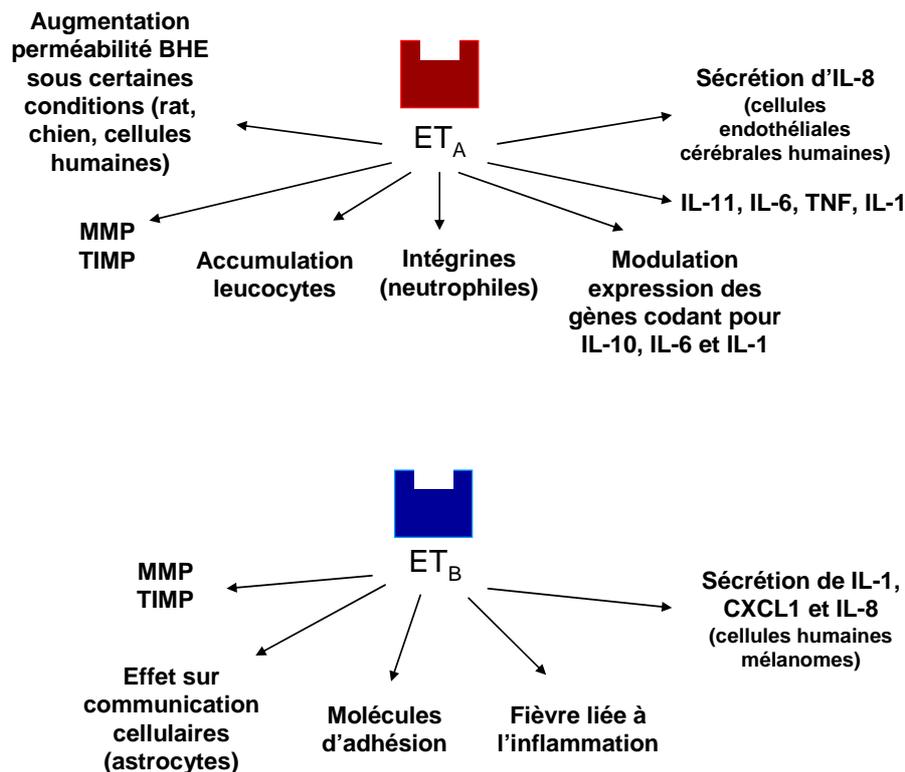


Figure 19 : Quelques exemples des éléments de l'inflammation sur lesquelles agissent les récepteurs ET_A et ET_B.

• Effet d'ET-1 sur les MMP

L'ET-1, via son récepteur ET_B et les voies FAK (Focal Adhesion Kinase) et ERK, induit l'activation des metalloprotéinases MMP2 et MMP9 dans des cellules humaines de mélanomes (Bagnato et al., 2004). Toujours chez l'homme, mais au niveau des astrocytes de la tête du nerf optique, l'ET-1 augmente l'expression de MMP2 et de ses inhibiteurs TIMP1 et TIMP2 (tissu inhibitors of matrix metalloproteinase) via ERK-MAPK et PKC (He et al., 2007). Chez le rat, une exposition au stress régule positivement MMP2 et MMP9 via l'activation d'ET_A (Ergul et al., 2003). Dans les cellules mésangiales de rat, l'ET-1 inhibe la production et l'activation de MMP2 (Yao et al., 2001). Notons qu'*in vitro*, MMP-2 est capable de cliver big-ET-1 pour donner une autre forme d'ET-1 avec une dizaine d'acides aminés supplémentaires, ET-1[1-32], possédant

aussi des propriétés vasoconstrictrices. ET-1[1-32] induit la libération, par la voie Ras/Raf-1/MEK/Erk, de MMP9 par les neutrophiles, MMP9 pouvant cliver bigET-1 en ET-1[1-32] et régulant ainsi le processus de façon positive (Fernandez-Patron et al., 1999).

- **Des facteurs de transcriptions communs entre ET-1 et les molécules de l'inflammation**

La transcription d'ECE-1 peut être régulée par Nkx2-5 (Funke-Kaiser et al., 2003). Nkx2-5 serait impliqué dans l'expression de molécules de l'inflammation, des jonctions serrées et, avec NF- κ B, dans le promoteur des peptides natriurétiques cérébraux (Saban et al., 2007).

- **Relation entre ET-1 et MCP-1**

L'étude des maladies inflammatoires rénales chez le rat *in vivo* a montré qu'en bloquant le TNF α , il s'ensuivait une diminution de l'excrétion de ET-1 et de MCP-1 (Elmarakby et al., 2008). Dans l'ischémie expérimentale rénale du rat, *in vivo*, la quasi abolition de l'activité de NF- κ B permet de réduire la quantité d'ARNm et la présence immunohistochimique de MCP-1 ainsi que l'expression d'ET-1 et de iNOS (inducible nitric oxyde synthase) (Cao et al., 2004).

Au niveau des cellules endothéliales aortiques de rat et de bovin, une molécule permettant l'ouverture des canaux potassium ATP dépendants provoquait l'inhibition de la sécrétion et de la synthèse d'ET-1, l'augmentation de la sécrétion de NO et l'augmentation du niveau basal de calcium intracellulaire libre. Cette même molécule inhibait la surexpression de MCP-1 observée dans certaines conditions (hyperglycémie...) (Wang et al., 2007).

Dans les cellules vasculaires musculaires lisses, un traitement inhibant la formation des FRO diminue aussi la production à la fois d'ET-1, IL-6 et MCP-1, et amoindrit l'activation de AP-1 et NF-kappaB (Ryu et al., 2007).

Dans le cadre du diabète de type 2, au niveau des fibroblastes, l'ET-1 augmente l'expression et la sécrétion de MCP-1 et IL-6, et ce, principalement via le récepteur ET_A (Solini et al., 2007).

Dans différentes études *in vitro*, la diminution ou l'augmentation d'ET-1 est souvent associée à celle de MCP-1 et vice-versa, sans que de corrélation directe n'ait été établie (Rajagopalan et al., 2003; Sohn et al., 2005; Verma et al., 2003). Chez des patients atteints de sclérose systémique le niveau d'ET-1 dans le sérum corrélait avec celui de MCP-1 (Peterlana et al., 2006).

Au niveau cérébral, et notamment au niveau des astrocytes, *in vivo* chez le rat, l'utilisation d'un agoniste spécifique du récepteur ET_B durant trois à sept jours induit la production de MCP-1 (Koyama et al., 2007). La microglie activée chez le rat présente une augmentation en ARN messagers d'ET-1 et de MCP-1 (Wu et al., 2006).

Les études *in vivo* sur un modèle de souris MCAO (middle cerebral artery occlusion) ont montré une induction d'ET-1 et de MCP-1 par l'ischémie, l'expression d'ET-1 précèdent celle de MCP-1. Des expériences *in vitro* réalisées par la même équipe sur des cellules endothéliales humaines dérivées du SNC de 4 patients mirent en évidence que 10 nM d'ET-1 induisaient sur ces cellules une augmentation de l'expression des ARNm de MCP-1 via le récepteur ET_A et PK-C (et non PK-A) après une heure d'incubation, et une augmentation de la sécrétion de MCP-1 après 24 heures d'exposition, le maximum correspondant à 48 heures d'exposition à l'ET-1. Cette augmentation est d'autant plus importante lorsque les cellules sont exposées à la fois à ET-1 et TNF α ou à ET-1 et IL-1 β (sachant qu'IL-1 β et TNF α seuls induisent également une augmentation de la sécrétion de MCP-1 mais qui n'a pas autant d'ampleur que conjugué avec ET-1) (Chen et al., 2001). MCP-

l induit l'augmentation en ARNm d'ET-1 et d'ECE, et la libération d'ET-1 par des cellules endothéliales humaines (Molet et al., 2000).

I-E. 6- Endothéline 1 et pathologies cérébrales

Des quantités plus élevées d'ET-1 ont été retrouvées dans le plasma et le LCR de patients souffrant d'hypertension, d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques et d'hémorragies subarachnoïdes (Masaoka et al., 1989; Suzuki et al., 1990; Yasuda et al., 1990), de sclérose en plaques (Haufschild et al., 2001; Speciale et al., 2000) ; dans le LCR de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Yoshizawa et al., 1992) et de l'encéphalopathie associée au VIH (Rolinski et al., 1999).

- Maladie d'Alzheimer

Non seulement le LCR de patients atteints de la maladie d'Alzheimer contient des quantités plus élevées d'ET-1, mais on décèle dans le cortex post mortem de patients (Minami et al., 1995) et au niveau des astrocytes de patients (Zhang et al., 1994b) une immuno-réactivité de type ET-1 accrue. Les auteurs firent l'hypothèse que ceci pouvait avoir un impact sur le flux de la microcirculation sanguine cérébrale qui est diminuée chez les malades. Des études sur des vaisseaux cérébraux isolés de patients et dans un modèle de souris transgénique de la maladie d'Alzheimer, montrent que les peptides amyloïdes β augmentent les propriétés vasoconstrictrices/vasodilatatrices d'ET-1 et que ceci serait en lien avec l'inflammation (Paris et al., 2003).

L'ECE-1 serait capable de dégrader les peptides amyloïdes β et serait donc impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Eckman et al., 2003). Les agonistes du récepteur ET_B ont un rôle protecteur sur les neurones contre la neurotoxicité des amyloïdes β (Yagami et al., 2002). D'autre part, chez des souris surexprimant les peptides amyloïdes β , un dysfonctionnement endothélial (perte de la vasodilatation dépendant de l'endothélium due à une diminution en vasodilatateurs tels que NO et à une augmentation des vasoconstricteurs dont ET-1) important dans la maladie d'Alzheimer pouvait être contrecarré par l'administration chronique d'antagonistes aux récepteurs d'ET, impliquant ainsi le système endogène des endothélines dans cette pathologie (Elesber et al., 2006).

- Maladie d'Hirschsprung

Des mutations dans les gènes codant pour ET-3 et ET_B expliqueraient certains cas familiaux de maladie d'Hirschsprung (Puffenberger et al., 1994; Tanaka et al., 1998).

- Encéphalopathie associée au VIH

Dans un modèle humain de BHE, une exposition à la protéine virale gp120 induit la production d'ET-1 par les cellules endothéliales cérébrales (Didier et al., 2002). Une corrélation a été établie entre la sévérité des encéphalopathies associées au VIH et la concentration en ET-1 dans le LCR des patients (Rolinski et al., 1999). Notons qu'il semble que certaines combinaisons thérapeutiques utilisées dans le traitement de l'infection par le VIH-1 engendrent des libérations d'ET-1 (Hebert et al., 2004).

- Glaucome

Les patients atteints de certains glaucomes ont un niveau d'ET-1 significativement supérieur à celui des personnes non atteintes (Noske et al., 1997; Sugiyama et al., 1995). La mort cellulaire causée par ET-1 pourrait être due à la l'activation de NOS (nitric oxide synthetase) et la production d'anion superoxyde, notamment dans le cas des neurones rétiniens (Oku et al., 2008).

- Ischémie/Hypoxie

Le niveau du récepteur ET_B est augmenté après un dommage ischémique ou hypoxique sur des cellules astrocytaires de rat (Shibaguchi et al., 2000) et suite à un neurotrauma sur des cellules gliales *in vivo* chez l'homme et l'animal (Rogers et al., 1997). Les dommages neuronaux sont augmentés chez les rats déficients en récepteur ET_B lors d'une exposition à une hypoxie/ischémie *in vivo* (Siren et al., 2002).

- Tumeurs cérébrales

L'expression d'ET-1 et de ses récepteurs a été démontrée dans les glioblastomes humains (Harland et al., 1995; Harland et al., 1998; Tsutsumi et al., 1994). Des études, sur des biopsies de tissus humains de glioblastomes, montrent que les ARNm de PPET-1, ECE-1 et ET_A sont surtout présents dans les vaisseaux tumoraux tandis qu'ET_B est surtout exprimé par les cellules tumorales (Egidy et al., 2000). Dans des lignées de cellules humaines de glioblastomes, ET-1 n'était pas impliquée dans la prolifération tumorale mais dans sa survie, probablement via la phosphorylation d'ERK et la voie PKC (Egidy et al., 2000).

- Migraines

ET-1 semble être impliqué dans les attaques migraineuses puisque son niveau augmente durant ces évènements (Gallai et al., 1994; Kallela et al., 1998). D'autre part, il y aurait aussi une relation entre le polymorphisme du récepteur ET_A et la migraine (Tzourio et al., 2001).

I-E. 7- L'endothéline 1 et les transporteurs ABC

Chez le rat, ET-1 provoque une régulation négative rapide du transport de la Pgp et ce, via le récepteur ET_B et l'activation des enzymes NOS et PKC (Hartz et al., 2004). Les études qui suivirent par la même équipe indiquent qu'ET-1 provoque une diminution de l'activité de la Pgp à des temps courts d'exposition (1 heure) puis qu'elle augmente l'activité du transporteur à des temps plus longs d'exposition (6 heures). Ce dernier phénomène semble lié à la libération de la Pgp internalisée ou inactivée et à l'augmentation de synthèse du transporteur (Bauer et al., 2007). La voie de signalisation alors impliquée passe par les récepteurs ET_A et ET_B qui, lorsqu'ET-1 s'y est fixé, activent NOS puis PKC provoquant l'activation de NF-κB (Nuclear Factor κB) et sa translocation depuis le cytoplasme vers le noyau ce qui engendre l'augmentation de l'expression de la Pgp (figure 20).

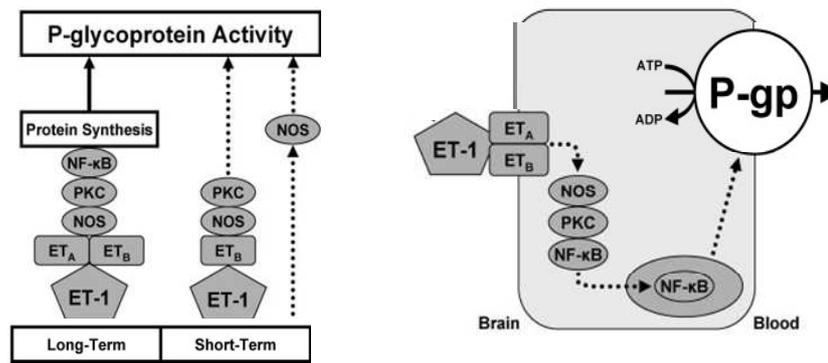


Figure 20 : Régulation de l'activité de la Pgp par l'ET-1 *in vitro* chez le rat. Extrait de (Bauer et al., 2007)

La MRP2, chez le poisson, peut être régulée par ET-1 : ET-1 se lie à ET_B ce qui active NOS et induit une augmentation de NO, qui à son tour active PKC conduisant à une modulation du transport par la MRP2 (Notenboom et al., 2002).

Notons que la MRP6 peut transporter l'antagoniste au récepteur endothéline BQ123 (Nies et al., 2004).

II- OBJECTIFS

Le SNC est un organe complexe et privilégié protégé, entre autres, par la BHE. Celle-ci, limite l'entrée des composés et xénobiotiques du fait de sa structure, comme les jonctions serrées, et de sa composition, avec la présence de transporteurs d'efflux spécialisés, notamment la Pgp. La BHE est un élément clé aussi bien dans la neuro-inflammation que dans beaucoup de pathologies cérébrales, elles même souvent associées à l'inflammation.

La neuro-inflammation est un processus complexe faisant intervenir des cellules spécialisées comme la microglie, les macrophages ou les lymphocytes, ainsi que des médiateurs tels que les cytokines (par exemple l'IL-6), les chimiokines (comme la MCP-1 et l'IL-8), et d'autres molécules comme les molécules d'adhésion et les MMP. Ces éléments de la neuro-inflammation agissent aussi au niveau de la BHE et de ses transporteurs.

Une autre molécule récemment impliquée dans la neuro-inflammation est l'endothéline 1. Ce peptide, aux multiples activités biologiques, est capable d'agir sur les MMP, les molécules d'adhésion, sur certaines cytokines et sur certaines chimiokines. L'ET-1 est d'ailleurs impliquée dans de nombreuses pathologies cérébrales comme la maladie d'Alzheimer, l'encéphalopathie associée au VIH, les tumeurs cérébrales ou encore l'ischémie cérébrale.

Peu de données de la littérature décrivent le rôle d'ET-1, à un niveau cérébral, sur l'IL-8, la MCP-1 et l'IL-6, toutes des cytokines et chimiokines très importantes de la neuro-inflammation.

L'ET-1 agit également sur la perméabilité de la BHE ainsi que sur les cellules qui la compose, et semble jouer un rôle dans la régulation de certains transporteurs ABC chez l'animal. Ainsi, chez le rat, l'ET-1 module l'activité de la Pgp présente au niveau de la BHE.

Les transporteurs ABC sont des pompes d'efflux prenant en charge un grand nombre de xénobiotiques et de molécules thérapeutiques. La compréhension de leur régulation est donc essentielle pour l'amélioration des thérapies visant le SNC.

Les données concernant la régulation des transporteurs ABC au niveau cérébral chez l'homme sont rares, aussi nos principaux objectifs furent de déterminer :

- l'effet de l'ET-1 sur l'expression et l'activité de certains transporteurs ABC au niveau de la BHE humaine,
- l'effet de l'ET-1 sur la sécrétion de cytokines et chimiokines inflammatoires par la BHE humaine.

Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de BHE humaine, composé de cellules gliales et de cellules endothéliales. Après avoir isolé les cellules et les avoir caractérisées, le modèle a été évalué puis soumis à l'action de l'ET-1. L'effet de l'ET-1 a été comparé dans deux modèles de BHE *in vitro* humaines. L'un était composé de cellules fœtales cérébrales humaines (afin d'étudier un contexte de transmission materno-fœtal), l'autre était composé de cellules adultes cérébrales humaines. Nous nous sommes alors attachés à regarder les effets du peptide sur la Pgp, la MRP1 et l'ABCG2 (ou BCRP), tant au niveau de leur expression protéique que de leur fonctionnalité. Nous avons également évalué la modulation induite par l'ET-1 sur la sécrétion de différentes cytokines inflammatoires, comme la MCP-1, l'IL-8 et l'IL-6.

III- MATERIEL et METHODES

III-A. Choix du modèle d'étude

Il était important pour notre équipe de pouvoir travailler sur le modèle humain de BHE. Dans la mesure où nous souhaitions voir les effets d'un peptide non neutre sur le plan physiologique, nous sommes naturellement tournés vers un modèle *in vitro* de BHE humaines.

Les modèles *in vitro* permettent une simplification de la structure mettant en avant les paramètres essentiels à étudier. Ainsi, il est possible de voir la réaction de la BHE en s'affranchissant de l'influence de tout autre organe, pathologie, état de stress ou autre. D'autre part, le modèle *in vitro* permet des études mécanistiques.

A l'heure actuelle, seules deux techniques permettent d'étudier la BHE humaine : la TEP (tomographie par émission de positrons), une méthode non invasive permettant de déterminer la perméabilité de la BHE pour un traceur radio-marqué, et la technique du modèle *in vitro* dans lequel les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (CEMC) forment une monocouche mimant la BHE (Cecchelli et al., 2007).

Il existe des lignées de cellules endothéliales cérébro-microvasculaires (Muruganandam et al., 1997), mais elles ne permettent pas d'avoir des jonctions serrées suffisamment restrictives (Cecchelli et al., 2007).

Les cellules issues de cultures primaires, lorsqu'elles sont utilisées précocement après un faible nombre de passages, conservent les propriétés biochimiques et morphologiques qui caractérisent la BHE *in vivo* (Cecchelli et al., 2007). Cependant, pour ce faire, les CEMC ont besoin de la présence de cellules gliales ou des facteurs qu'elles génèrent (Dehouck et al., 1990; Wolburg et al., 1994).

Certaines équipes ont obtenu la meilleure imperméabilité d'une monocouche endothéliale d'un modèle de BHE de rat lorsque ces cellules étaient co-cultivées à la fois avec des astrocytes et des péricytes (Nakagawa et al., 2007).

Ci-après nous décrirons les méthodes, le matériel étant inventorié à la fin de ce chapitre.

III-B. Le modèle humain de BHE

III-B. 1- Obtention des tissus et cellules

Les méthodes utilisées sont basées sur les travaux de (Josserand et al., 2006; Megard et al., 2002)

Des échantillons cérébraux, correspondant à des parties de tissus sains, issus de cortectomies de patients épileptiques (prélèvements chez des adultes testés négatifs pour le HIV-1, l'hépatite B et les tumeurs cérébrales) nous étaient délivrés tout de suite après l'opération pour que nous les traitions dans les meilleurs délais. Ils étaient maintenus à 4°C durant le transport.

Après avoir soigneusement retiré les méninges, les échantillons sont broyés puis lavés dans 20 mL d'HBSS avec antibiotiques PSN (50 µg/mL de pénicilline et streptomycine, 100 µg/mL de néomycine). Une centrifugation de 5 minutes à 1500 rpm (390 g) et 4°C permet de séparer l'échantillon du HBSS. L'échantillon est alors repris dans 15 mL d'une solution de collagénase dispase (HBSS sans calcium ni magnésium contenant PSN, 1 mg/mL de collagénase dispase, 10 mM d'Hepes, 20 unités/mL de DNase I, 0.147 µg/mL de TLCK). Le temps de digestion est d'1h30 à 37°C avec agitation toutes les 10-15 minutes. Ensuite, une centrifugation de 5 minutes à 390g et 4°C permet d'éliminer le surnageant. Un gradient BSA 20% est ensuite employé pour séparer les cellules gliales des cellules endothéliales via une centrifugation de 30 min à 2900 rpm (soit 1400g) à 4°C.

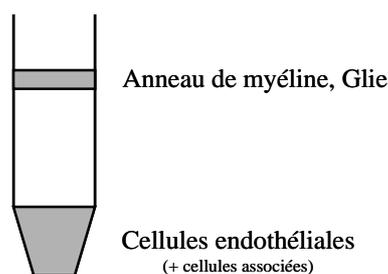


Figure 21 : Séparation des cellules endothéliales et gliales par gradient de BSA.

L'anneau de myéline (figure 21) est alors séparé et rincé avec du HBSS contenant les PSN. Le surnageant jeté, le culot de myéline est resuspendu dans du milieu pour cellules gliales (50% V/V de milieu MEM α , 50% de milieu HAM, 5% V/V de SVF, 50 µg/mL pénicilline et streptomycine, 100 µg/mL néomycine, 1% V/V de sérum humain provenant du plasma AB de personnes de sexe masculin, et hFGF-B), et mis en culture à 37°C 5% de CO₂ dans des flasques ventilés de 75 cm² (préalablement enduits 1 heure à température ambiante avec de la poly-L-lysine à 0.13 µg/cm²).

Le surnageant de BSA au dessus des cellules endothéliales est éliminé. Le culot de cellules endothéliales est de nouveau digéré par une solution neuve de collagénase dispase (même composition que précédemment) pendant 1 heure à 37°C. Après une centrifugation de 5 minutes à 390 g et 4°C, le surnageant est retiré.

Le culot est ensuite resuspendu dans du milieu de culture pour cellules endothéliales (contenant EMB-2, 5% V/V de SVF, VEGF, Hydrocortisone, R³-IGF-1, acide ascorbique, rhFGF-B, Rh EGF et gentamicine) et filtré sur une membrane ayant des pores de 100 µm afin de séparer les cellules endothéliales isolées des capillaires. L'éluat est centrifugé 5 min à 390 g et 4°C, le surnageant jeté et le culot resuspendu dans 5 mL de milieu de culture et déposé dans un flasque de 25 cm² pré-enduit pendant 2 heures de collagène IV (environ 2 µg/cm²). Les cellules restées sur le filtre sont détachées de celui-ci par agitation manuelle dans du milieu de culture pour cellules endothéliales et mises dans un flasque de 25 cm² pré-enduit pendant 2 heures de collagène IV.

Les cellules endothéliales *in situ* sont associées à d'autres types cellulaires comme les cellules musculaires lisses, les péricytes, les cellules microgliales et les astrocytes (Pardridge, 1999). Ainsi, afin d'éliminer d'éventuelles cellules contaminantes, de la puromycine est ajoutée dans le milieu afin de sélectionner spécifiquement les cellules endothéliales qui expriment plus largement la Pgp, capable d'effluer la puromycine, que les cellules contaminantes (Perriere et al., 2005).

Dans les deux cultures de cellules endothéliales est ajouté 2 µg/mL final de puromycine. Les cultures sont alors placées à 37°C, 5% CO₂.

Les milieux sont changés tous les 2 jours. Les cellules sont trypsinisées à 80-90% de confluence.

III-B. 2- Caractérisation des cellules

- **Caractérisation des cellules gliales**

S100B est exprimé dans toutes les cellules gliales (astrocytes, cellules épendymales, oligodendrocytes, microglie, cellules de Schwann) (Steiner et al., 2007). Nous aurions pu nous en servir comme marqueur, cependant, nous souhaitons nous focaliser sur les marqueurs des cellules impliquées dans la BHE.

La vimentine est présente dans un grand nombre de types cellulaires. Beaucoup de cellules mises en culture semblent se mettre à exprimer la vimentine (Buniatian, 1997). Ainsi un marquage vimentine peut s'avérer être un bon contrôle positif.

La GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), un filament intermédiaire, n'est pas seulement exprimée par les astrocytes, mais aussi par des cellules d'origine non neurale comme, par exemple, les cellules de Leydig dans les testicules (Buniatian, 1997; Holash et al., 1993). La GFAP est exprimée dans les astrocytes matures (Martinez et al., 1998), elle augmente lors de leur activation due à des dommages cérébraux ou des maladies (Eng et al., 2000) et son expression est présente dans certaines cellules souches donnant des progéniteurs gliaux (Liu et al., 2006). Le niveau de GFAP augmente dans les astrocytes au cours de la vie chez l'homme et le rat (Eng et al., 2000). Il existe plusieurs morphologies pour les astrocytes, selon leur localisation et les autres types cellulaires en présence (Abbott et al., 2006) et tous les astrocytes n'expriment pas la même quantité de GFAP (Walz, 2000). Les astrocytes en culture possèderaient toujours une grande quantité de GFAP (Walz, 2000). L'expression de SMAA (Smooth Muscle Alpha Actine) diminue lors de la différenciation astrocytaire (Abd-El-Basset et Fedoroff, 1991; Buniatian, 1997).

La NG2 (neuronal/glial 2) est exprimée dans les progéniteurs gliaux (Yoo et Wrathall, 2007). Dans les astrocytomes, l'expression de NG2 est augmentée (Seyfried et al., 2008). NG2 ne semble pas exprimée dans les cellules possédant la GFAP *in vivo*, et les astrocytes et la glie exprimant NG2 seraient deux populations cellulaires distinctes (Nishiyama et al., 2005). Des précurseurs pluripotents se retrouvent dans le cerveau adulte et, *in vitro*, certaines cellules NG2 se comportent comme des précurseurs astrocytes-oligodendrocytes de type 2, pouvant donner des astrocytes et des oligodendrocytes (Karram et al., 2005).

Les péricytes ont un contenu riche en actines musculaires et non musculaires (Herman et D'Amore, 1985). Pour les caractériser, il n'y a pas de marqueur spécifique, et aucun marqueur ne reconnaît tous les péricytes. SMAA, par exemple, ne semblent pas exprimée par les péricytes cérébraux dans les conditions normales, en tout cas chez la souris. Il faut cependant garder à l'esprit qu'il y a des différences de marquages entre les espèces (Armulik et al., 2005). Il semble ainsi que certaines sous-populations de péricytes expriment SMAA chez d'autres mammifères (Nehls et Drenckhahn, 1991), et lorsqu'ils sont en culture en présence de sérum (Dore-Duffy et al., 2006). Certains utilisent des doubles marquages comme SMA (smooth muscle actin) et NG2, pour marquer les péricytes humains du capillaire rétinien (Miller et al., 2006).

La SMAA est exprimée par les cellules musculaires lisses (Hughes et Chan-Ling, 2004) qui sont aussi présentes au niveau des vaisseaux sanguins, notamment au niveau des micro-vaisseaux cérébraux (Seidel et al., 1991). NG2 n'est exprimée que de façon sporadique et en faible quantité par les cellules musculaires lisses (Hughes et Chan-Ling, 2004). SMAA pourrait être également exprimée par les cellules progénitrices neurales (Morishita et al., 2007). Notons que les cellules musculaires lisses peuvent se différencier en péricytes et inversement (Armulik et al., 2005).

Nous avons ainsi utilisé la NG2 et la GFAP comme marqueurs des cellules gliales, la présence de péricytes éventuels ne nous alarmant pas, au contraire, puisqu'ils ont été démontrés comme renforçant les propriétés de la BHE *in vitro* (Nakagawa et al., 2007). Nous avons également effectué des marquages de SMAA afin d'évaluer la proportion de péricytes.

Dans la mesure où NG2 a également été montrée comme exprimée par les fibroblastes du nerf périphérique chez le rat et l'homme (Morgenstern et al., 2003), et comme les péricytes peuvent se différencier en fibroblastes (Armulik et al., 2005), nous avons également utilisé un marqueur spécifique des fibroblastes, CD90. En effet, CD90 (Cluster of Differentiation 90) ou Thy-1, est exprimé chez l'homme dans les fibroblastes, les neurones, les cellules souches sanguines et les cellules endothéliales (Rege et Hagoood, 2006). Ainsi, dans une fraction de cellules cérébrales composée de cellules gliales, CD90 ne devrait correspondre qu'aux fibroblastes.

La caractérisation de la microglie (ou de macrophages résidents du SNC) utilisait pour marquage CD11b et CD68 (Guillemin et Brew, 2004).

- **Caractérisation des cellules endothéliales**

Nous n'avons pu réaliser des marquages claudine ou ZO des monocouches de CEMC humaines (ces marquages avaient déjà été réalisés précédemment par l'équipe) car il nous aurait fallu les faire croître sur insert, ce qui impliquait une utilisation non négligeable de cellules, puis les observer en microscopie confocale, impliquant une manipulation de l'insert peu évidente sans endommager la monocouche. Une culture en chambre labtek avait pour inconvénient une adhérence modifiée des cellules, même avec un enduit de la surface au collagène IV ou à la fibrinectine, et donc certainement une expression des jonctions altérée.

Nous avons ainsi préféré un marquage CD31 (ou PECAM-1 pour Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) des cellules endothéliales. Cette molécule se trouve en grande quantité dans les cellules endothéliales, concentrée au niveau des contacts cellule-cellule, et située sur le domaine apical des jonctions intracellulaires sans pour autant être structurellement associée aux jonctions serrées (Ayalon et al., 1994). CD31 est impliquée dans l'adhésion cellule-cellule via des interactions avec d'autres CD31 ou avec d'autres protéines comme certaines intégrines (Buckley et al., 1996).

CD31 se retrouve aussi à la surface des monocytes, des macrophages, des neutrophiles, des cellules NK, des lymphocytes et des plaquettes, mais en densité beaucoup plus faible que dans les cellules endothéliales (Muller, 2003).

- **Protocole de l'immuno-marquage pour visualisation en microscopie à fluorescence**

Les cellules sont mises en culture dans des chambres de Labtek, enduites ou non selon le type de cellules (enduit de collagène IV pour les CEMCH adultes, enduit de fibronectine pour les CEMCH fœtales, enduit de poly-L-lysines pour les CGH fœtales, pas d'enduit pour les CGH adultes) et ce, à différents passages. Les milieux de culture utilisés pour les cellules adultes sont ceux décrits plus haut, et ceux du fournisseur pour les cellules fœtales. Une fois les cellules arrivées à confluence, les surnageants sont retirés des chambres. Les cellules sont fixées et perméabilisées avec du Cytifix/Cytoperm (300 µL par chambre) durant 20 minutes à 4°C, puis lavées une fois avec 500 µL de PermWash 1x. Les anticorps non couplés à un fluorochrome sont alors additionnés dans les chambres dans 250 à 300 µL final de PerWash. Une incubation d'une heure à 4°C est réalisée, puis trois rinçages avec 500 µL de PermWash. L'anticorps secondaire couplé ou l'anticorps primaire couplé à un fluorophore est additionné dans 250 à 300 µL final de PerWash par chambre et incubé une heure à 4°C. Trois rinçages avec 500 µL de PermWash sont réalisés. Ensuite, dans chaque chambre sont ajoutés 500 µL d'une solution DAPI à 0.6 µg/mL et incubé 8 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante. Trois rinçages avec du PBS sont réalisés, les chambres sont ôtées ; sur la lame où se trouvent les cellules est versé un peu de solution de montage et une sur-lamelle est placée au-dessus. Les lames sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière en attendant la visualisation au microscope à fluorescence.

III-B. 3- Principe et obtention des barrières

Les méthodes utilisées sont basées sur les travaux de (Josserand et al., 2006; Megard et al., 2002). Le modèle *in vitro* humain de BHE est une co-culture de deux types cellulaires, les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines, d'une part, et de cellules gliales ou astrocytaires humaines qui conféreront aux cellules endothéliales leurs propriétés spécifiques.

- **Co-culture des cellules pour le modèle *in vitro* de BHE adultes :**

Pour ce modèle *in vitro* de BHE, les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (CEMCH) et les cellules gliales humaines (CGH) précédemment obtenues sont utilisées entre les passages 2 et 4. Il s'agit d'un modèle autologue dans lequel les CEMCH d'un patient sont cultivées en présence des CGH du même patient (figure 22).

Pour ce modèle, nous utilisons des Transwell® (que nous appelons aussi insert) de 12 mm de diamètre dont la membrane est en polystyrène et perforée de pores de 0,4 µm.

Les CGH sont d'abord mises en culture dans le compartiment basal. 20 000 cellules par puits sont cultivées dans 1.5 mL de milieu pour cellules gliales. 24 heures après, le milieu des CGH est changé et les CEMCH sontensemencées dans le compartiment apical, les inserts ayant été enduits durant 2 heures par du collagène IV, à raison de 50 000 cellules par puits dans 0.5 mL de milieu de culture pour cellules endothéliales, dans lequel le VEGF est remplacé par deux facteurs secrets. Le VEGF est en effet soupçonné de conduire à une augmentation de la perméabilité de la BHE *in vitro* (Colgan et al., 2008). Les barrières ainsi obtenues sont mises en culture à 37°C, 5% CO₂. Le milieu est changé tous les deux jours, totalement en apical, et seulement à moitié en basal.

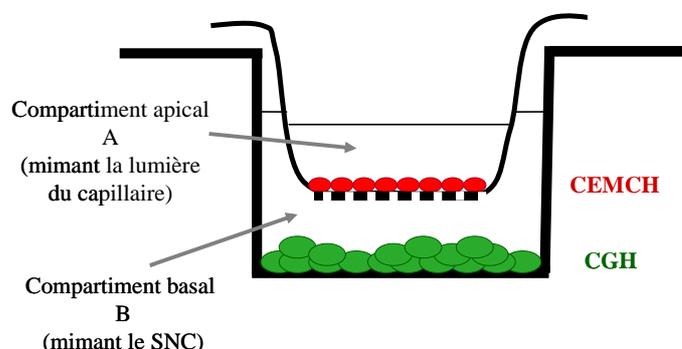


Figure 22 : Schématisation du modèle *in vitro* de BHE. CEMCH pour cellules endothéliales micro-vasculaires cérébrales humaines, et CGH pour cellules gliales humaines.

Les barrières sont prêtes entre les 15^{ème} et 21^{ème} jours.

- **Co-culture des cellules pour le modèle *in vitro* de BHE foetales :**

Le principe reste le même, mais le système n'est pas autologue. La différence réside aussi dans le fait que les cellules gliales sont ici des astrocytes, leurs puits sont enduits avec 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de poly-L-lysine, et l'enduit de l'insert se fait avec de 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectine. Les milieux de cultures sont ceux fournis par Sciencell. Ces barrières sont prêtes entre les jours 6 et 11.

III-B. 4- Evaluation de l'intégrité de la monocouche de cellules endothéliales : test de passage de sucrose

La vérification de l'intégrité des barrières se faisait sur 2 inserts d'une plaque de 12. Si la monocouche de cellules endothéliales est correcte, elle possède les propriétés des cellules endothéliales de la BHE *in vivo*, à savoir les différentes jonctions dont les jonctions serrées, ce qui limite ainsi la diffusion, soit le passage paracellulaire et transcellulaire des composés, même ceux de petite taille et non toxiques comme le sucrose (Hjelle et al., 1978; REED et WOODBURY, 1963). Ainsi, un test de passage du sucrose était effectué afin d'évaluer l'intégrité de la BHE obtenue *in vitro*.

Pour ce test, les inserts voient leur surnageants retirés et sont positionnés sur une plaque propre. Du tampon de transfert (150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 0.2 mM MgCl₂, 6 mM NaHCO₃, 2.8 mM Glucose et 5 mM HEPES) est ajouté à raison de 1.5 mL en basal et 0.5 mL en apical. Du sucrose marqué au ¹⁴C est additionné dans le milieu apical pour l'obtention d'une concentration finale de 0.37 10¹⁰ Bq/mL (0.1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$). La plaque contenant les barrières est placée 30 minutes à 37°C, 5% CO₂ et sous agitation douce. Les surnageants sont

ensuite récupérés et 100 μL de chaque sont passés au compteur à scintillation en présence de 4 mL d'Aqualuma+.

Les dpm (désintégrations par minute) permettent alors de calculer le flux du sucrose depuis le compartiment apical vers le compartiment basal (CL_{AB}). Pour ce calcul, il y a 3 coefficients de perméabilité à prendre en compte :

Pst : celui de la membrane + celui de la membrane de l'insert.

Psf : celui correspondant à la membrane de l'insert seul (pores de 0.4 μm)

Pe : celui correspondant à la monocouche de CEMCH

$$\text{Flux} = \text{Pst} = \frac{\text{dpm du côté opposé}}{\text{dpm à l'état initial}} \times \text{Volume du côté opposé en } \mu\text{L} \times \frac{1}{\text{Temps en min}}$$

$$\frac{\text{Flux}}{\text{A vers B}} = \frac{\text{Pst}}{\text{A vers B}} = \frac{\text{dpm du côté B}}{\text{dpm à l'état initial}} \times \frac{1500 \mu\text{L}}{\text{min}} \longrightarrow \text{Résultat en } \mu\text{l/min}$$

$$\frac{1}{\text{Pe}} = \frac{1}{\text{Pst}} - \frac{1}{\text{Psf}}$$

Mais en réalité, comme $\text{Psf} \gg \text{Pst}$, on a

$$\frac{1}{\text{Pe}} = \frac{1}{\text{Pst}}$$

Il faut ensuite tenir compte de la surface du filtre pour obtenir le $\text{Pe}_{\text{réel}}$. Le filtre fait 1 cm^2 et 1 μl correspond à 10^{-3}cm^3 :

$$\text{CL}_{\text{AB}} = \text{Pe}_{\text{réel}} = \text{Pe} \times 10^{-3}$$

en
en
Correspond
 $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$
 $\mu\text{l/min}$
au 1 cm^2

On obtient un résultat en cm/minute , ou en $\text{cm}/\text{seconde}$.

Les barrières n'étaient considérées comme fonctionnelles que pour un CL_{AB} inférieur à 0.5 $\mu\text{l/min}$ (soit inférieur à $8 \times 10^{-6} \text{cm/sec}$).

III-C. Exposition des cellules à l'ET-1 et aux antagonistes

III-C. 1- Concentrations physiologiques d'ET-1 chez l'homme

Dans le cadre d'analyse de la douleur, les concentrations plasmatiques d'ET-1 ont été étudiées. Chez les patients contrôles, ces concentrations étaient de l'ordre de 2.69 ± 0.73 pg/ml (Eisenberg et al., 2004). Des prélèvements effectués dans des régions analogues dans le cadre d'une étude des concentrations plasmatiques d'ET-1 lors de l'exercice musculaire montraient un taux d'ET-1 avoisinant les 1.6 pg/mL (Tanabe et al., 2000). Chez des patients infectés par le VIH-1 et atteints d'encéphalopathie, la concentration en ET-1 dans le LCR était de 1.97 ± 2.33 pmol/L tandis qu'elle était de 0.57 ± 0.67 pmol/L chez les patients ne montrant pas de dysfonctionnement neurologique (Rolinski et al., 1999). Chez des patients avec vasospasmes cérébraux causés par subarachnoid hemorrhage, les concentrations d'ET-1 dans le LCR se situent aux environs de 2.45 pg/mL (soit 1 pmol/L, le poids moléculaire d'ET-1 étant de 2492 g/mol), tandis qu'elles sont inférieures à 0.85 pg/mL (soit 0.34 pmol/L) chez les patients sains (Suzuki et al., 2000). Chez l'homme, la clairance d'ET-1 sur 24 heures oscille entre 1.7 pg/ml à 6.8 ng/ml (Cantaro et al., 2001; Modesti et al., 2000).

Narushima et al. considèrent qu'une dose modérée (après laquelle l'animal récupère en quelques heures) d'ET-1 injectée *in vivo* dans le LCR animal est de l'ordre de 4 pmol/kg, pour le chien et 10 pmol/kg pour le rat (Narushima et al., 2003).

III-C. 2- Choix des concentrations d'ET-1

Notre équipe avait obtenu des résultats sur un modèle *in vitro* de BHE en utilisant des concentrations d'ET-1 allant de 40 à 400 nM, et pour des expositions de 24 heures (Didier et al., 2003). Les travaux de Hartz et al. (2004) étudiaient l'effet de l'ET-1 sur la BHE de rat *in vitro*, et pour ce faire employaient des doses d'ET-1 de 1 à 100 nM. L'étude des cellules endothéliales cérébrales humaines en monoculture avait montré une dose optimale d'ET-1 de 10 nM pour voir le maximum d'effet (Chen et al., 2001), tandis que Zidovetzki et al (1999), sur le même type de cellules, étudiaient l'action d'ET-1 à 100 nM. De faibles doses d'ET-1 (0.1 nM) induisent la sécrétion de CXCL1 et d'IL-8 dans des cellules humaines de mélanomes. Ce phénomène est concentration dépendant et les résultats furent davantage étudiés pour 10 nM d'ET-1. (Mangahas et al., 2005)

De plus, notre équipe avait également trouvé que dans un contexte inflammatoire, lorsque des CEMCH co-cultivées avec des astrocytes sont exposées au TNF α , il s'ensuit une sécrétion d'ET-1 dans le compartiment apical (Didier et al., 2003).

Ainsi, nous avons choisi des concentrations d'ET-1 de 1 nM, 10 nM et 100 nM.

III-C. 3- Exposition des BHE à l'ET-1

Notre équipe avait précédemment trouvé qu'ET-1 était libéré dans le surnageant apical de BHE humaines fœtales stimulées par le TNF α (Didier et al., 2003). Ainsi, dans nos expériences, l'ET-1 était mis dans le compartiment apical des BHE humaines *in vitro*. Les concentrations choisies étaient de 1 nM, 10 nM et 100 nM. Les aliquots d'ET-1 étant conservé dans 5% d'acide acétique, les cellules témoins étaient exposées à la même quantité d'acide acétique que les cellules exposées à ET-1.

III-C. 4- Antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B

Pour l'étude de l'effet d'ET-1 sur la BHE de rat, Bauer et al. (2007) ont utilisé comme antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B les molécules JKC-301 et RES-701-1 à une concentration de 100 nM. Hartz et al. (2004) utilisaient ces mêmes antagonistes à des concentrations de 100 nM et 10 nM, respectivement.

Nous avons ainsi choisi comme antagoniste du récepteur ET_A, JKC-301, et comme antagoniste du récepteur ET_B, RES-701-1. Tous deux seront employés à une concentration de 100 nM.

III-D. Evaluation de l'expression des transporteurs ABC

III-D. 1- Evaluation de l'expression des ARN en RT PCR

Les cellules sont rincées au PBS et lysées sur plaque avec la solution de lyse du kit de chez Sigma, en présence de β mercapto-éthanol. La solution de lyse est passée sur les colonnes du kit Sigma, le protocole Sigma étant suivi. Les ARN obtenus sont dilués dans de l'eau stérile puis dosés : les densités optiques (DO) à 260 et 280 nm sont mesurées au spectrophotomètre dans une cuve en quartz. Le ratio DO₂₆₀/DO₂₈₀ doit être compris entre 1.8 et 2. Alors, la rétro-transcription est effectuée avec le protocole et le kit Qiagen. Les amorces pour la rétro-transcription comprennent à la fois des amorces avec queues poly dT, permettant la rétro-transcription des ARN messagers, et des 'random primers' permettant la rétro-transcription de tout ARN ne possédant pas de queue poly A (ARNm non matures etc...).

La RT PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) est ensuite réalisée sur les ADNc obtenus, le gène de ménage choisi étant la GAPDH. Pour ce faire, le protocole et les amorces Qiagen sont utilisés, avec le mix SybrGreen de Biorad. Des dilutions de l'ADNc sont faites afin d'évaluer les efficacités de PCR.

Pour l'analyse des résultats, la méthode de Livak est employée lorsque les efficacités de PCR sont très proches de 100% ; autrement nous avons recours à la méthode de Pfaffl, pour des efficacités comprises entre 90 et 105 %.

III-D. 2- Evaluation de l'expression protéique en cytométrie de flux

Les cellules sont rincées avec du PBS puis décollées de leur support avec de la trypsine/EDTA (3 à 5 minutes à 37°C), puis du TNS (trypsin neutralising solution) est ajouté. La suspension

cellulaire est alors répartie dans des tubes FACS (un volume égal dans chaque tube) et centrifugée 5 minutes à 390g et 4°C.

- **Fixation et perméabilisation des cellules :**

Après avoir retiré les surnageants, les cellules sont, durant 20 minutes à 4°C, fixées et perméabilisées avec du Cytofix/Cytoperm. 400 µL de Permash 1 x est ajouté et les tubes centrifugés 5 minutes à 4°C et 390g. Le surnageant éliminé, les anticorps primaires sont incubés dans 60 µL de permash 1 heure à 4°C (à l'abri de la lumière dans le cas d'anticorps couplés à des fluorochromes). Deux lavages sont réalisés comme suit : ajout de 400 µL de permash et centrifugation de 5 minutes à 4°C et 390g. Le cas échéant, l'anticorps secondaire couplé est ajouté dans 60 µL de permash et incubé une heure à 4°C à l'abri de la lumière. Après deux lavages, comme décrit précédemment, 400 µL de FACSflow sont ajoutés. Les tubes sont maintenus à 4°C en attendant leur passage au cytomètre de flux.

- **Cellules non perméabilisées :**

Les cellules, après la centrifugation, subissent un lavage : 500 µL de PBS sont ajoutés puis une centrifugation de 390g à 4°C permet de se débarrasser du surnageant. 75 µL de PBS est ajouté sur les cellules, puis l'anticorps couplé au fluorophore. L'incubation est alors d'une heure à 4°C. Deux lavages, comme précédemment, sont réalisés. 400 µL de cellfix 1x (dilué dans de l'eau déionisée stérile) sont ajoutés. Les cellules sont incubées minimum 10 minutes à 4°C avant la lecture en cytométrie de flux.

- **Cytométrie de flux :**

5000 à 10000 cellules sont passées au cytomètre pour chaque condition et chaque anticorps. Le cytomètre de flux permet de déterminer la taille, la granulométrie et l'intensité de fluorescence (proportionnelle au nombre d'anticorps couplés à un fluorochrome se fixant sur la cellule). Afin d'écarter les débris cellulaires ou anticorps non liés de l'analyse, seuls les éléments de taille (forward light scatter FSC-H supérieur à 200) et de granulométrie (side scatter SSC-H supérieur à 200) suffisantes sont comptabilisés et considérés dans l'analyse de l'intensité de fluorescence (figure 23).

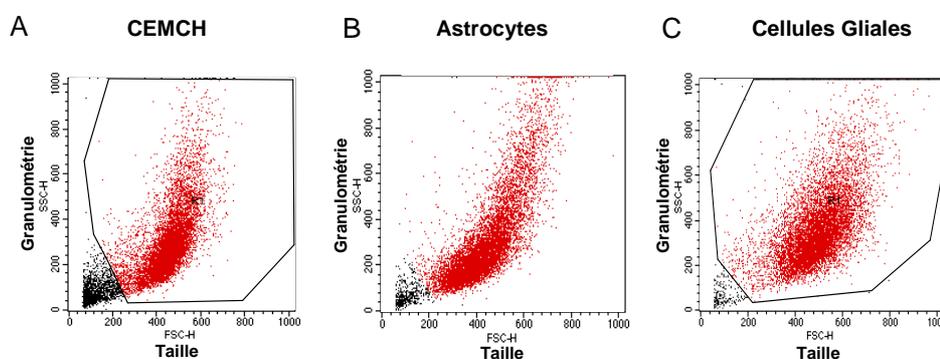


Figure 23 : Sélection des éléments (en rouge) qui seront comptabilisés et dont la fluorescence sera évaluée par cytométrie de flux. **A-** Un exemple pour des CEMCH ; **B-** Un exemple pour des astrocytes humains ; **C-** Un exemple pour des cellules gliales humaines.

III-E. Evaluation de la fonctionnalité du transporteur Pgp :

Test de passage de la digoxine

La digoxine est un substrat spécifique de la Pgp (Fernandez et al., 2004; Goralski et al., 2003). Elle peut être prise en charge par d'autres types de transporteurs chez les rongeurs et dans les reins humains, mais aucune donnée ne montre un tel phénomène au niveau de la BHE humaine (Hagenbuch et al., 2002; Kodawara et al., 2002; Mikkaichi et al., 2004). De plus, la digoxine est le substrat recommandé dans l'étude de la Pgp (Rautio et al., 2006).

Pour ce test de passage de la digoxine, les inserts voient leur surnageants retirés et sont positionnés sur une plaque propre. Du tampon de transfert (150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 0.2 mM MgCl₂, 6 mM NaHCO₃, 2.8 mM Glucose et 5 mM Hepes) est ajouté à raison de 1.5 mL en basal et 0.5 mL en apical. De la digoxine marquée au ³H est additionnée dans le milieu apical ou basal de telle manière que la concentration finale soit de 0.1 μM. Cette concentration fut choisie en accord avec la littérature (Rautio et al., 2006; Sababi et al., 2001). La plaque contenant les barrières est ensuite placée 1 heure à 37°C, 5% CO₂ et sous agitation douce. Les surnageants sont ensuite récupérés et 100 μL de chaque sont passés au compteur à scintillation en présence de 4 mL d'Aqualuma+.

Les flux A vers B (CL_{AB}) et B vers A (CL_{BA}) sont ensuite calculés. CL_{AB} est calculé de la même façon que lors du test de passage du sucrose. CL_{BA} est calculé comme suit :

$$\text{Flux} = \text{Pst} = \frac{\text{dpm du côté opposé}}{\text{dpm à l'état initial}} \times \text{Volume du côté opposé en } \mu\text{L} \times \frac{1}{\text{Temps en min}}$$

$$\text{Flux}_{\text{B vers A}} = \frac{\text{Pst}_{\text{B vers A}}}{\text{B vers A}} = \frac{\text{dpm du côté A}}{\text{dpm à l'état initial}} \times \frac{500 \mu\text{L}}{\text{min}} \longrightarrow \text{Résultat en } \mu\text{l/min}$$

Les simplifications et équivalences d'unités sont les mêmes que pour CL_{AB}. Soit :

$$\text{CL}_{\text{BA}} = \text{Pe}_{\text{réel}} = \text{Pe} \times 10^{-3}$$

↙ en cm.min⁻¹
↑ en μl/min
↘ Correspond au 1 cm²

Une fois que ces flux ont été obtenus, un ratio Q est calculé :

$$Q = \frac{\text{CL}_{\text{BA}}}{\text{CL}_{\text{AB}}}$$

Ce ratio reflète non seulement la polarité de la barrière (l'efflux se produit de B vers A et le passage est limité de A vers B) mais aussi son intégrité. Plus Q est élevé, plus le composé étudié traverse difficilement la barrière et/ou est grandement efflué.

III-F. Quantification des cytokines sécrétées

Cette quantification a été réalisée par deux techniques, le Bio-Plex et l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays).

La première est celle du Bioplex de Biorad qui permet de quantifier un grand nombre de cytokines à la fois. Le principe, très brièvement, est basé sur la technique d'immuno-marquage en sandwich et repose sur la présence d'anticorps spécifiques de la molécule d'intérêt sur des billes couplées à un fluorochrome spécifique (ainsi, à chaque molécule correspondant une fluorescence spécifique). Un deuxième anticorps biotinylé et, lui aussi, spécifique de la molécule d'intérêt (mais d'un autre épitope), vient se fixer sur la molécule. Le 'sandwich' ainsi créé autour de la molécule est détecté par de la streptavidine couplée à la phyco-erythrine, la streptavidine se liant à l'anticorps biotinylé. Une réaction enzymatique induit alors un changement de colorimétrie. La présence de la molécule d'intérêt est déterminée à la fois par le changement de colorimétrie et la fluorescence spécifique.

La deuxième technique employée est celle de l'ELISA. Brièvement, il s'agit aussi d'une technique dite sandwich. Des anticorps spécifiques de la molécule d'intérêt sont fixés sur un support solide (plaque de 96 puits). Un deuxième anticorps, également spécifique de la molécule d'intérêt, mais pour un autre épitope, vient se fixer. Ce deuxième anticorps est couplé à une enzyme (par exemple la HRP pour HorseRadish Peroxydase). Le substrat de celle-ci (par exemple la TMB, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) vient se fixer au 'sandwich' et induit un changement de colorimétrie. Une solution d'acide chloridrique est ensuite en général additionnée pour stopper la réaction. La densité optique, observée à la longueur d'onde adéquate, est proportionnelle à la quantité de molécules d'intérêt. Le protocole suivi était dans chaque cas celui du fournisseur, car il s'agissait de plaques pré-enduites avec les anticorps.

III-G. Matériel

Plaques et inserts	Fournisseurs
<p>Transwell® en polycarbonate de 0.4µm, plaque de 12 puits ; Plaque de 12 puits</p> <p>Plaque de culture cellulaire Greiner</p> <p>Lab-tek Chamber Slide System, 4 puits sur lame</p>	<p>Corning, Sigma-Aldrich (Allemagne)</p> <p>Dutscher</p> <p>Fisher Scientific Bioblock, NuncBrand (France)</p>
Anticorps pour les immuno-marquages	Fournisseurs
<p>Tous les anticorps ci-après sont dirigés contre les molécules humaines. Les fluorochromes utilisés sont le FITC (fluorescein isothiocyanate), le PE (phycoerythrine) et l'Alexa Fluor 488. Les concentrations utilisées furent celles préconisées par les fournisseurs</p> <p>Anti GFAP non couplé, clone G-A-5 IgG1 de souris IgG1 de souris non couplé clone MOPC-21 Anti GFAP couplé Cy3, IgG1 de souris Anti SMAA couplé FITC clone 1A4 IgG2a de souris IgG2a de souris couple FITC clone UPC-10 Anti CD11b couplé FITC clone 44 IgG1 de souris Anti BCRP de souris, IgG2a clone BXP-21 IgG2a de souris</p> <p>Anti NG2 de souris, IgG1 Anti MRP1 de souris couplé PE IgG1 de souris couplé PE</p> <p>IgG1 de souris couplé FITC Anti Pgp de souris couple PE, IgG2a clone UIC2 IgG2a de souris couplé PE clone 7T4-1F5</p> <p>Anti CD31 couplé FITC, IgG1 de souris clone VP025 IgG1 de souris couplé FITC clone MOPC-21 Anti CD68 de souris, IgG2b clone Y1/82A IgG2b de souris clone 27-35</p> <p>Anti CD90 de souris, IgG1 clone AS02</p> <p>Anti vimentine polyclonal de lapin non couplé</p> <p>Anti IgG souris de chèvre couplé Alexa Fluor 488 Anti IgG lapin de chèvre couplé Alexa Fluor 488</p>	<p>Sigma-Aldrich (Allemagne) :</p> <p>R&D Systems (Allemagne)</p> <p>Immunotech, Beckman Coulter (France):</p> <p>BD Biosciences (USA)</p> <p>Calbiochem (Allemagne)</p> <p>Abcam (Angleterre)</p> <p>Invitrogen Molecular Probes (Pays-Bas)</p>
Kit ELISA	Fournisseurs
<p>Human MCP-1 ELISA Biotrak System IL-6 Human Biotrak Easy ELISA</p> <p>Human MMP-3 Instant ELISA Human MMP-9 ELISA new version</p>	<p>Amersham (GE Healthcare, Buckinghamshire, Royaume-Uni)</p> <p>Bender MedSystems (Vienne, Autriche)</p>

Machines et logiciels	
<ul style="list-style-type: none"> •Compteur pour la radioactivité : 1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter de LKB Wallac / Logiciel : Compteur Beta 1214, GenTerm V2.B •Appareil de PCR : iCycler de chez BioRad (USA) / Logiciel : iCycler iQ Optical System Software version 3.0a •Lecteur des plaques ELISA : Multiskan Ascent de Labsystems / Logiciel : Biolise 2.65 Rev 6 •BioPlex : Bio-Plex System de Bio-Rad / Logiciel: Bio-Plex Manager 4.0 •Microscope à fluorescence : IX71 de chez Olympus (avec U-LH100HG) / Logiciels : Image-Pro Plus 5.0 et Image J •Microscope à contraste de phase : CKX 41 d'Olympus / Logiciel : Explora Nova Morpho Ultra Lite •Spectrophotomètre : HP8453 modèle G1103A de Hewlett Packard / Logiciel : HP8453 UV-Visible System 1 •Cytomètre de flux : FACS Calibur de Becton Dickinson / Logiciel : CellQuest •Centrifugeuse de paillasse : Centrifuge 5415R de chez Eppendorf (Clamart, France) Centrifugeuse : Jouan GR4i Centrifuge de chez Thermo Electron Corporation •Poste de sécurité Microbiologique type II : Jouan , Thermo Electron Industries Hotte de biologie moléculaire: Biocap RNA/DNA, Captair Bio de chez ErLab •Incubateur : Klasse 3.1 CB150, Binder (Tuttlingen, Allemagne) Bain Marie: Grant Sub type Sub 28, Grant Instruments (Cambridge, Angleterre) •Balances : LP 2200 S de Sartorius; AC 211S de Sartorius •Logiciel pour les statistiques: Prism 5 de GraphPad 	
Solutions, réactifs et cellules	Fournisseurs
<p>Aqualuma plus High Capacity LSC cocktail de chez Lumac-LSC</p> <p>DNase I from bovine pancreas ; Collagenase dispase</p> <p>Digoxine radiomarquée 3H</p> <p>Sucrose radio-marqué 14C</p> <p>Bio-Plex cytokine Reagent kit ; x-Plex assays kit</p> <p>Endothéline 1 humaine</p> <p>Antagoniste au récepteur ETB [RES-701-1] ; Antagoniste au récepteur ETA [JKC 301]</p> <p>Milieu de culture pour les cellules endothéliales adultes (EGM-2 MV endothélial med, single quot kit) ; Solution de trypsine/EDTA ; TNS (Trypsin Neutralising Solution)</p> <p>Milieu pour cellules endothéliales cérébrales humaines ; Milieu pour astrocytes humains; cellules fœtales astrocytaires et endothéliales microvasculaires cérébrales</p> <p>Cytofix/Cytoperm ; PermWash ; CellFix ; FacsFlow</p> <p>kit GenElute Mammalian Total RNA d'extraction et purification des ARN ; SybrGreen pour la RT PCR et mix pour RT PCR ; Puromycine ; Cyclosporine A (BioChemika) ; Sérum humain de donneur masculins de plasma AB ; TLCK (Nα-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride) (BioChemika) ; Collagène IV from human placenta ; Poly-L-lysine ; Fibronectine ; DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenyindole) ; BSA (albumine de serum de bovin) ; DMSO (Dimethyl sulphoxyde) ; Solution de montage Polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO, antifading ;</p> <p>Kit QIAGEN QuantiTect Reverse Transcription de retro-transcription de l'ARN en ADNc ; amorces Quantitect Primer Assay RT PCR</p> <p>SVF (sérum de veau fœtal) (Gibco) ; Milieu MEM alpha (Gibco); Milieu F-12 (HAM) avec Glutamine (Gibco) ; Cocktail d'antibiotiques PSN (pénicilline, streptomycine, neomycine) (Gibco) ; D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) avec ou sans Calcium et Magnesium (Gibco); Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) sans calcium ni magnesium (Gibco).</p>	<p>Lumac-LSC (Pays-Bas)</p> <p>Roche (France)</p> <p>PerkinElmer (France)</p> <p>Amersham (Angleterre)</p> <p>Bio-Rad (USA)</p> <p>Bachem (France)</p> <p>Alexis Biochemical</p> <p>Lonza (Suisse)</p> <p>Promocell (Allemagne)</p> <p>Becton Dickinson (USA)</p> <p>Sigma-Aldrich (Allemagne)</p> <p>Qiagen (Allemagne)</p> <p>Invitrogen</p>

Tableau 1 : Liste du matériel utilisé pour les expériences.

IV- RESULTATS

Nous avons étudié deux modèles de BHE humaines *in vitro*. Le premier est un modèle adulte permettant de parfaire notre compréhension de la modulation de l'expression et de l'activité de la Pgp, un transporteur d'efflux des médicaments, ainsi que notre compréhension du rôle de l'ET-1 dans la neuro-inflammation. Le second modèle était de type fœtal et fut, en autres, choisi dans le but de comparer les mécanismes entre les situations fœtale et adulte et dans le cadre des transmissions materno-fœtales.

IV-A. Les modèles *in vitro* de BHE humaines adultes et fœtales

Deux types de modèle ont été utilisés : un modèle autologue adulte de BHE humaines, composés de cellules adultes (cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines ou CEMCH adultes, et cellules gliales humaines ou CGH adultes), et un modèle fœtal de BHE humaines, composés de cellules fœtales (CEMCH fœtales et cellules astrocytaires fœtales).

IV-A. 1- Les cellules de la BHE adulte

- **Les cellules endothéliales adultes**

Après isolement, les cellules n'étaient considérées que lorsque leur morphologie était correcte (petites cellules en virgule ou arrondies, parfois très légèrement oblongues) (figure 24) et que le marquage CD31 était positif (figure 25).

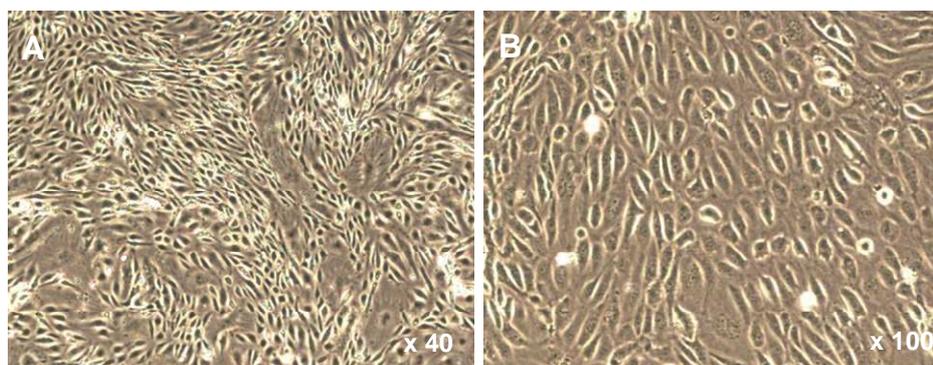


Figure 24 : Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines adultes à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à contraste de phases. **A-** Cellules observées avec un grossissement de 40 fois ; **B-** Cellules observées avec un grossissement de 100 fois.

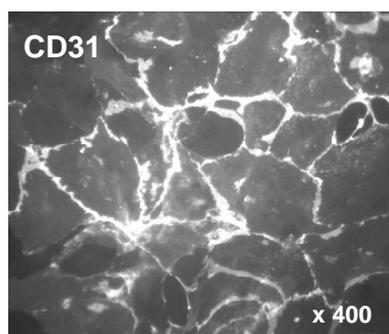


Figure 25 : Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines adultes à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à fluorescence. Cellules immuno-marquées avec un anticorps spécifique de CD31 (grossissement de 400 fois).

La CD31 est bien présente au niveau des contacts cellules-cellules.

- **Les cellules gliales adultes**

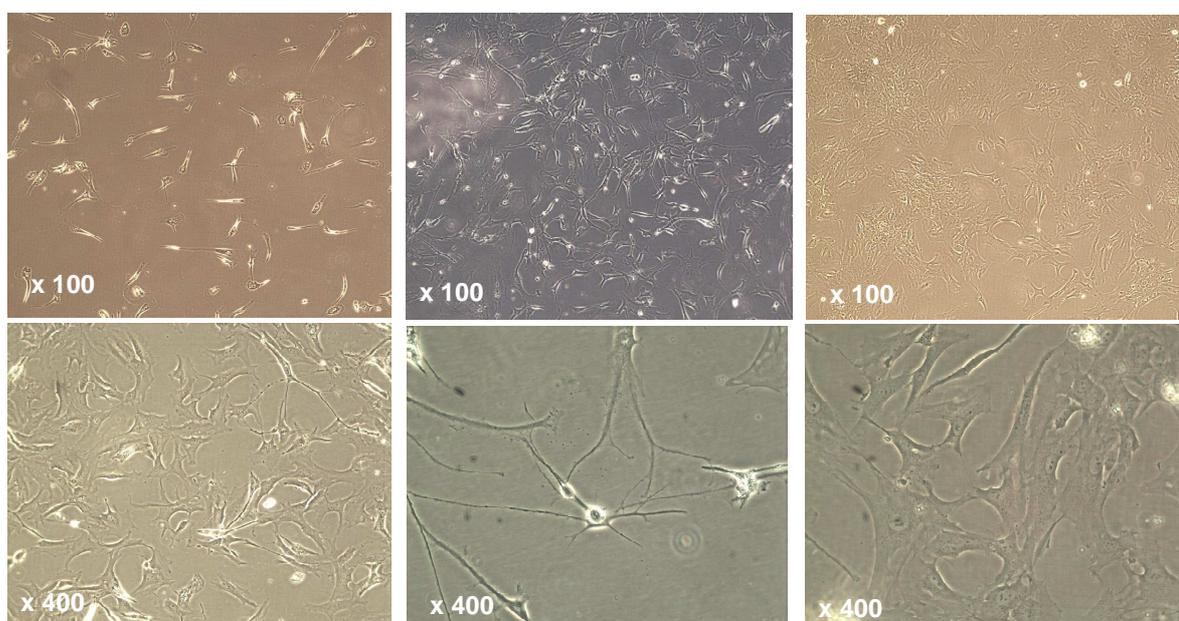


Figure 26 : Cellules gliales humaines adultes à des passages précoces (P1 à P3) visualisées au microscope à contraste de phases.

Le marquage des cellules gliales humaines adultes pouvait montrer des populations cellulaires différentes d'un patient à l'autre. Ainsi, les cellules gliales présentaient une proportion en cellules GFAP positives variable. Ce qui restait relativement stable était la proportion en cellules SMAA positives et NG2 positives, toujours supérieure à 50%, et souvent proche de 80% pour NG2 (figure 27). Nous remarquons, d'après les doubles marquages, que les cellules exprimant SMAA ne sont pas nécessairement des cellules musculaires ou des péricytes, puisqu'elles peuvent aussi exprimer la GFAP. Ainsi, les cellules gliales considérées étaient surtout composées d'astrocytes (marquages GFAP et SMAA), de précurseurs gliaux (marquages NG2), de péricytes (marquages NG2 et SMAA) et parfois de quelques cellules microgliales (marquages CD11b et CD68, mais ces cellules étaient largement minoritaires). Le marquage de CD90, caractéristique des cellules fibroblastiques, était insignifiant (figure 27).

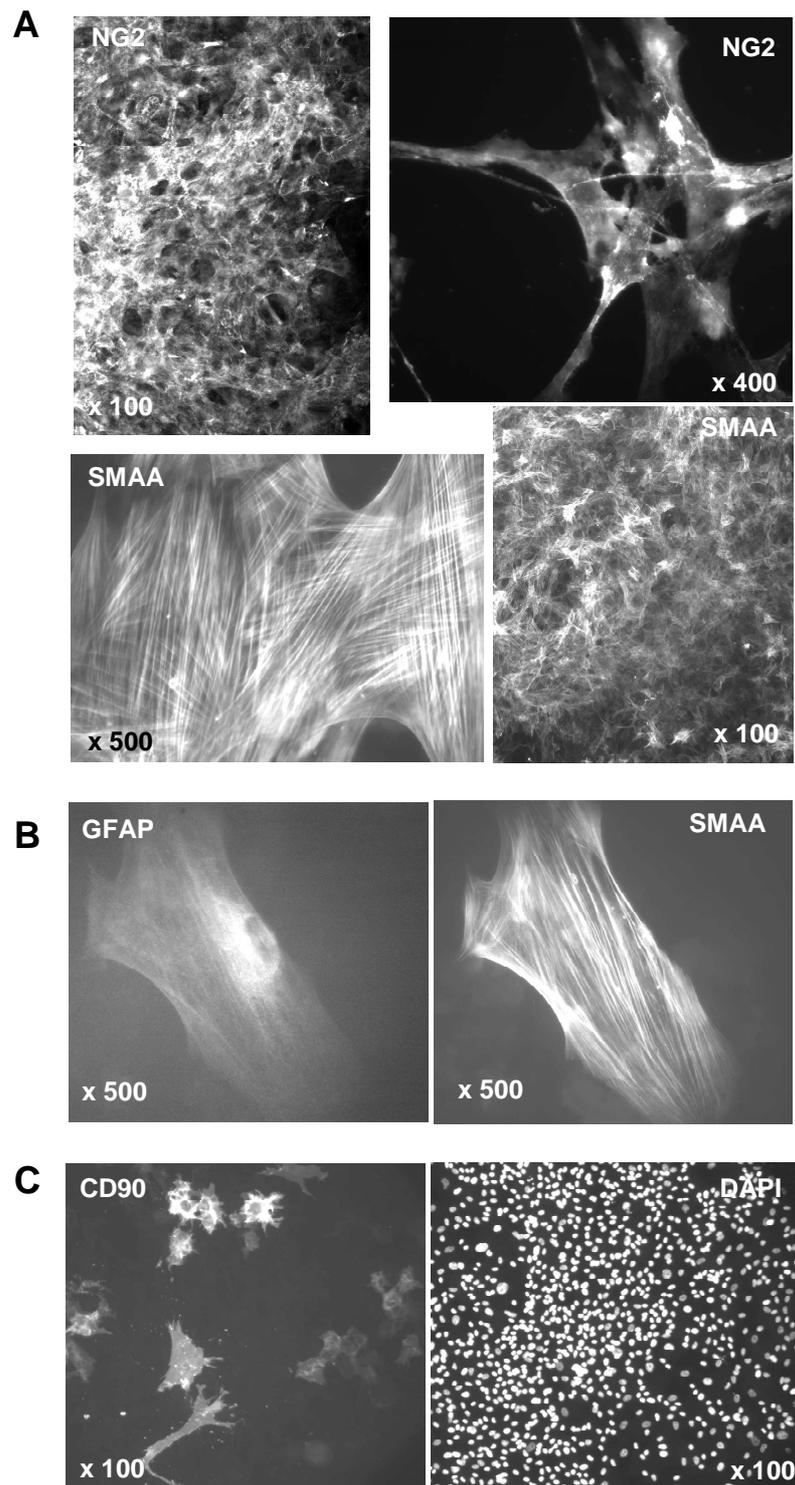


Figure 27 : Cellules gliales humaines adultes à des passages précoces (P1 à P3) observées au microscope à fluorescence. **A-** Les cellules ont été immuno-marquées soit par un anticorps spécifique de NG2 (les 2 premières photos), soit un anticorps spécifique de SMAA (les 2 photos du milieu). **B-** Les cellules ont été doublement immuno-marquées par un anticorps spécifique de la GFAP (à gauche) et un anticorps spécifique de SMAA (à droite). **C-** Les cellules ont été marquées par un anticorps spécifique de CD90 (à gauche) ou au DAPI (à droite). Les marquages aux anticorps couplés à des fluorochromes pouvaient ensuite être visualisés au microscope à fluorescence.

IV-A. 2- Les cellules de la BHE pré-natale

- Les cellules endothéliales fœtales

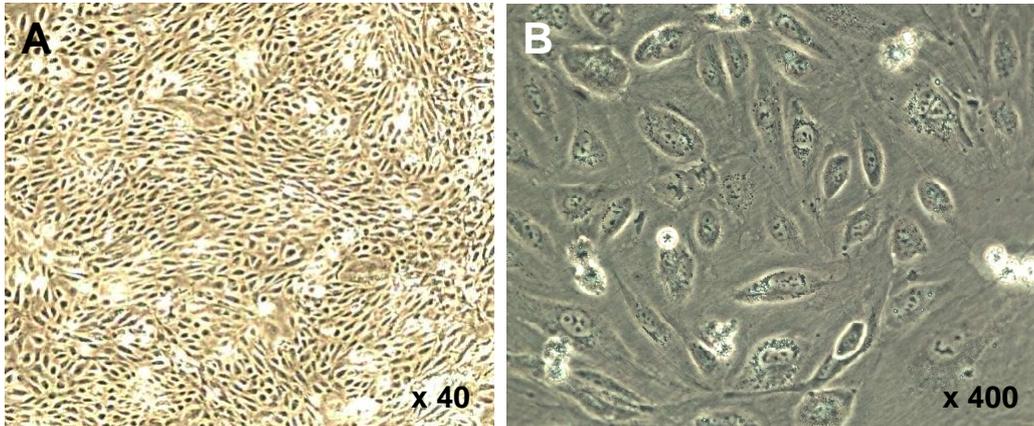


Figure 28 : Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines fœtales à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à contraste de phases. **A**- Cellules observées avec un grossissement de 40 fois ; **B**- Cellules observées avec un grossissement de 200 fois.

Comme les cellules adultes, les cellules fœtales sont arrondies, en virgule ou légèrement allongées (figure 28).

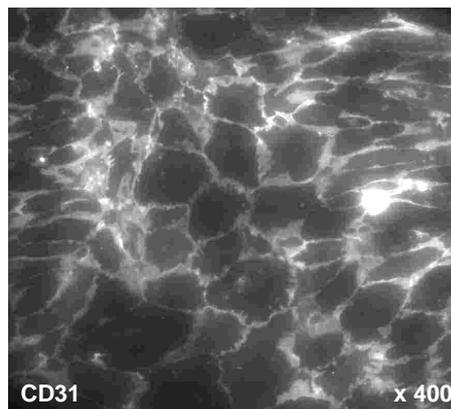


Figure 29 : Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines fœtales à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à fluorescence. Cellules immuno-marquées avec un anticorps spécifique de CD31 et observées au microscope à fluorescence avec un grossissement de 400 fois.

Comme pour les CEMCH adultes, les CEMCH fœtales étaient utilisées lorsque le marque CD31 s'avérait positif (figure 29).

- Les cellules astrocytaires foetales

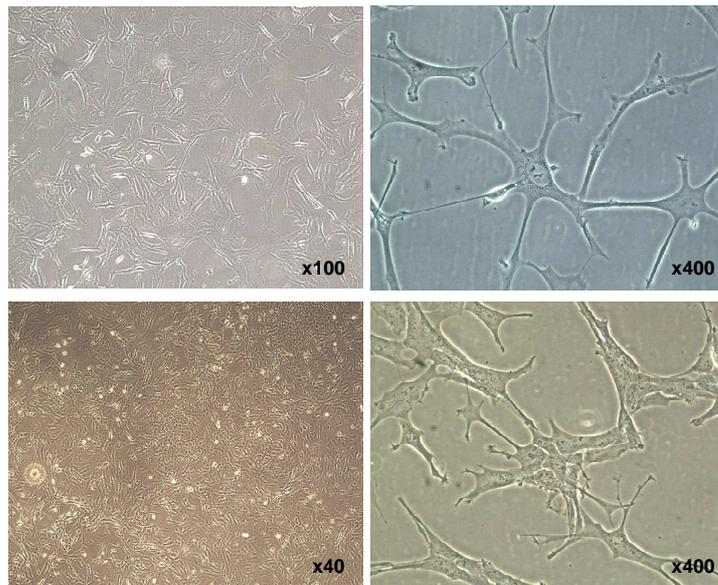


Figure 30 : Cellules astrocytaires humaines fœtales à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à contraste de phases.

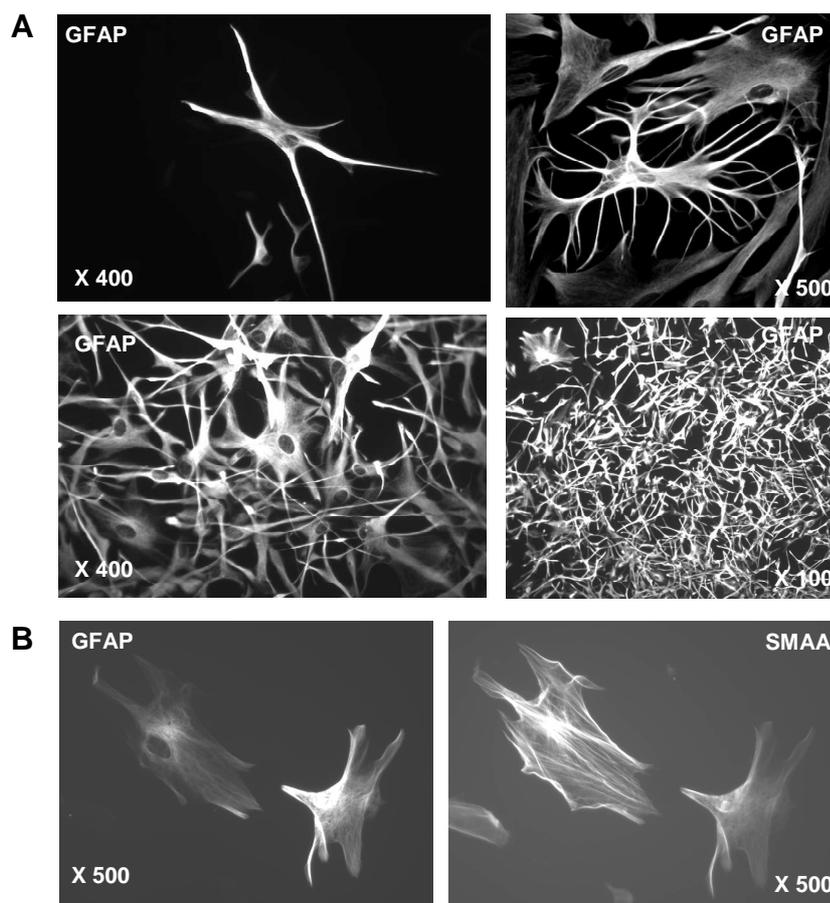


Figure 31 : Cellules astrocytaires humaines fœtales à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à fluorescence. A- Cellules observées après immuno-marquage de la GFAP. B- Cellules observées après un double immuno-marquage de la GFAP (photo de gauche) et de la SMAA (photo de droite).

Les cellules gliales fœtales étaient validées pour un marquage GFAP positif, correspondant à un marquage astrocytaire (figure 31). Dans la mesure où les cellules gliales humaines adultes présentaient un marquage SMAA positif et parfois une co-localisation de SMAA et GFAP, nous avons effectué des doubles marquages GFAP et SMAA des cellules astrocytaires fœtales. Il y a effectivement une co-localisation de SMAA et GFAP dans certaines cellules, bien que d'autres n'expriment soit que GFAP soit que SMAA (figure 31). Il est probable qu'en culture les cellules acquièrent ou perdent certaines de leurs différenciations.

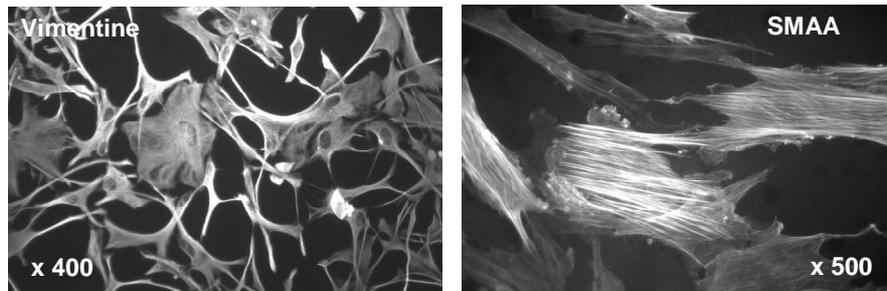


Figure 32 : Cellules astrocytaires humaines fœtales à des passages précoces (P1 à P2) observées au microscope à fluorescence après un immuno-marquage de la Vimentine (à gauche) et de la SMAA (à droite).

IV-A. 3- L'intégrité des BHE humaines pré-natales et adultes

L'intégrité des BHE était estimée en fonction du passage de sucrose radio-marqué. Cette petite molécule permet l'évaluation du passage para-cellulaire et donc indirectement la présence de jonctions serrées.

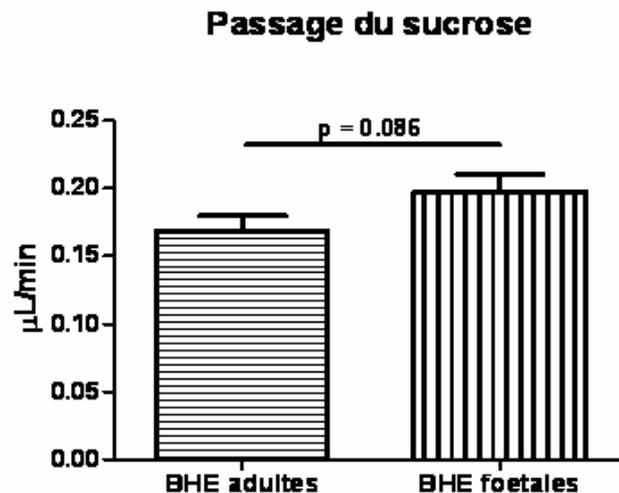


Figure 33 : Evaluation de l'intégrité des monocouches de CEMCH de modèles *in vitro* de BHE adultes et fœtales par le passage de sucrose radio-marqué. (Moyenne effectuée sur 70 BHE testées dans chaque cas, provenant d'un total de 4 patients pour le modèle adulte). Un test bilatéral de Student a été ensuite réalisé.

Les BHE adultes ont un flux moyen du sucrose de $0,17 \pm \text{SEM } 0,011 \mu\text{L}/\text{min}$ (ou $2,8 \times 10^{-6} \pm \text{SEM } 0,018 \times 10^{-6} \text{ cm}/\text{sec}$) (figure 33). Les BHE fœtales ont un flux moyen de sucrose de $0,198 \pm \text{SEM } 0,013 \mu\text{L}/\text{min}$ (ou $3,3 \times 10^{-6} \pm \text{SEM } 0,022 \times 10^{-6} \text{ cm}/\text{sec}$) (figure 33).

Les BHE adultes sont légèrement plus imperméables que les BHE fœtales et cette tendance se vérifie statistiquement (valeur $P = 0.086$), sans doute en raison de la présence de plusieurs types de cellules gliales en basal, et non simplement d'astrocytes.

Les deux modèles *in vitro* de BHE humaines, adultes et fœtales, étaient donc composés de cellules endothéliales correctement caractérisées par le CD31, et de cellules gliales caractérisées par la GFAP et le NG2, et possédaient une bonne intégrité de la monocouche des cellules endothéliales (faible passage du sucrose).

IV-B. Expression des transporteurs par les cellules de ces BHE humaines

Les transporteurs ABC ont un rôle important puisqu'ils permettent d'effluer du SNC des molécules potentiellement toxiques, ainsi qu'un grand nombre de molécules thérapeutiques. Il est donc intéressant de connaître leur niveau d'expression et leur activité.

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir quels étaient les transporteurs dont le gène était exprimé par les cellules que nous allions étudier, une fois mises en culture. Pour ce faire, nous avons regardé le niveau d'expression en ARN des gènes des trois transporteurs principaux, Pgp, MRP1 et BCRP (ou ABCG2). Les amorces n'ayant pas donné entière satisfaction en termes d'efficacité de PCR, les résultats des courbes d'amplification sont juste donnés à titre indicatif (en abscisses le nombre de cycle d'amplification, en ordonnées la fluorescence), afin de montrer la présence des ARN, sans qu'aucun calcul de comparaison relative n'ait été appliqué. Les courbes de fusion attestent de la présence d'un seul produit amplifié.

Nous avons également évalué le niveau d'expression protéique totale des transporteurs, c'est-à-dire à la surface de la membrane plasmique et en intra-cellulaire, en utilisant la méthode de marquage spécifique par un anticorps couplé à un fluorochrome, et une lecture en cytométrie de flux.

IV-B. 1- Expression des ARN

Ces expériences de RT-PCR sont qualitatives. Il s'agit initialement de comparaisons entre la quantité d'ARN codant pour la Pgp, la MRP1 et l'ABCG2 avec la quantité d'ARN d'un gène de ménage, la GAPDH. Sur les courbes d'amplification, nous regardons le nombre de cycles au bout duquel la fluorescence augmente. Les différences d'expression sont évaluées par la comparaison du nombre de cycles de PCR (CT). Plus un gène est exprimé, plus le nombre de cycles de PCR est faible.

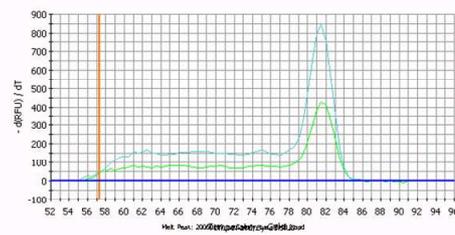
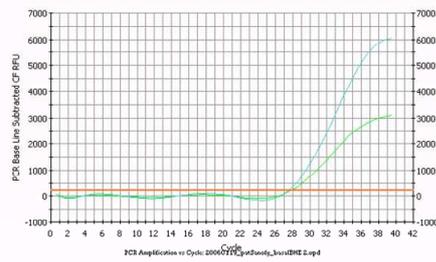
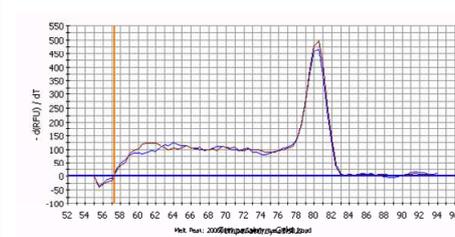
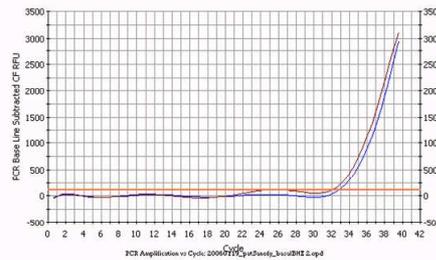
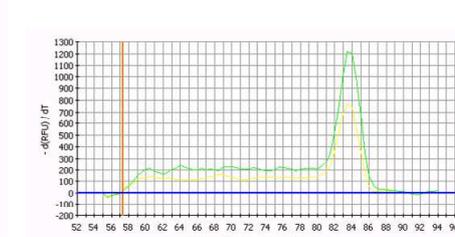
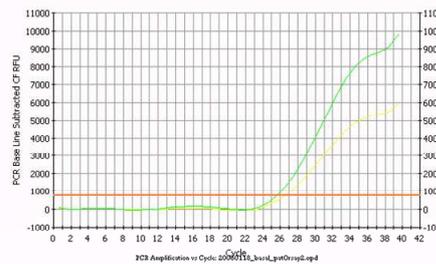
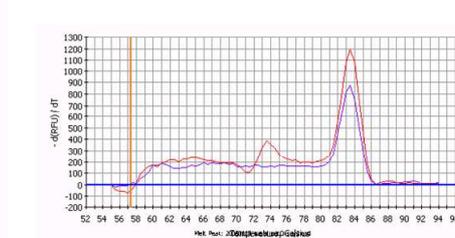
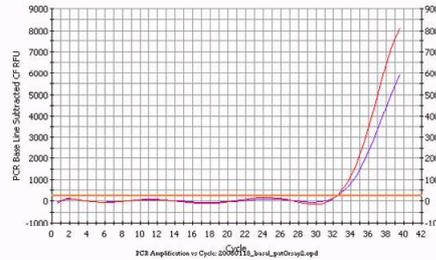
GAPDH**Pgp****MRP1****BCRP**

Figure 34 : Expression des ARN totaux de cellules endothéliales cérébrales humaines rétro-transcrits et amplifiés en RT PCR. La colonne de gauche montre les courbes d'amplification (en abscisses le nombre de cycle d'amplification, en ordonnées la fluorescence), celle de droite les courbes de fusion (en abscisses la température en degré celsius, en ordonnées la dérivée de la courbe d'amplification par rapport à la température). Les deux courbes de chaque figure sont des duplicatas.

Les ARN des trois transporteurs sont donc exprimés dans les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (figure 34).

IV-B. 2- Expression des protéines

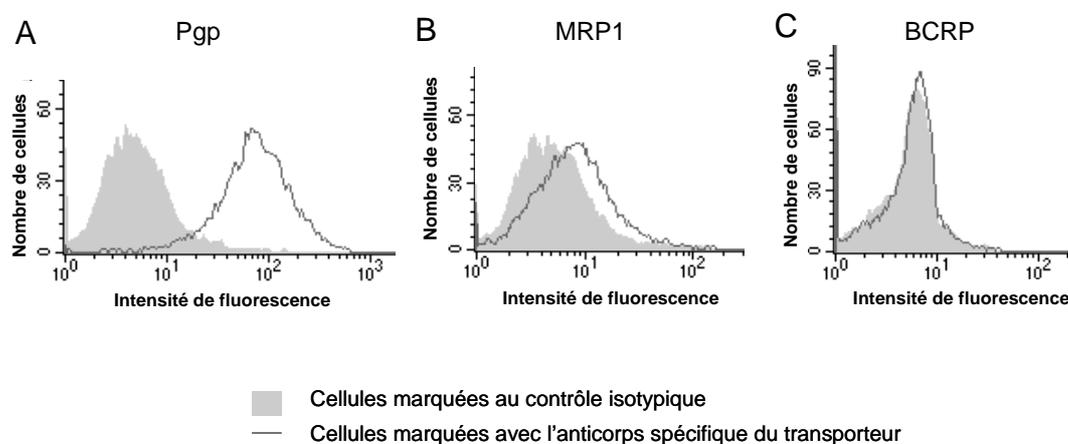


Figure 35 : Expression protéique totale de la Pgp, de la MRP1 et de la BCRP (ou ABCG2), évaluée en cytométrie de flux, sur des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines. Les cellules étaient perméabilisées, fixées et marquées avec un anticorps couplé à un fluorochrome, l'anticorps étant un contrôle isotypique ou un anticorps spécifique de l'un des transporteurs. **A**- Expression de la Pgp ; **B**- Expression de la MRP1 ; **C**- Expression de la BCRP (ou ABCG2).

La Pgp est bien présente dans les CEMCH. En revanche, la présence de la MRP1 est plus timide, et celle de l'ABCG2 (ou BCRP) n'est pas décelable dans nos conditions (figure 35). L'ABCG2 est pourtant connue pour être présente sur les cellules endothéliales cérébrales humaines (Cooray et al., 2002). Ainsi, soit l'anticorps utilisé n'a pas suffisamment d'affinité pour l'ABCG2 ou il est mal détecté en cytométrie de flux, soit la mise en culture des cellules provoque une diminution de l'expression de ce transporteur, soit l'expression de l'ABCG2 par les CEMCH est induite par un autre type cellulaire (les cellules gliales par exemple). On pourrait d'ailleurs se faire le même type de réflexion concernant la faible expression protéique de MRP1.

IV-C. Effet de l'endothéline 1 sur le modèle *in vitro* humain de BHE

La compréhension de la régulation des transporteurs ABC est importante dans le traitement des maladies cérébrales. Chez l'animal, l'ET-1 module l'expression et l'activité de certains transporteurs ABC, et l'ET-1 et ses récepteurs sont exprimés au niveau de la BHE humaine. Ainsi, nous avons souhaité savoir si l'ET-1 avait une influence sur l'expression et l'activité de la Pgp au niveau de la BHE humaine ; et nous avons comparé cet effet sur les modèles adultes et fœtaux de BHE humaines.

L'endothéline 1 était ajoutée dans le compartiment apical A (mimant la lumière du capillaire, voir la figure 22) du modèle de BHE. Le temps de 24 heures d'expositions fut choisi en accord avec des résultats antérieurs et la littérature.

IV-C. 1- Effet de l'endothéline 1 sur le modèle pré-natal humain de BHE

- Effet de l'ET-1 sur l'expression de la Pgp des BHE fœtales

Les BHE fœtales étaient exposées 24 heures à différentes concentrations d'ET-1. Les cellules étaient ensuite trypsinisées, perméabilisées et fixées, puis marquées soit avec un anticorps contrôle isotypique, soit avec un anticorps spécifique de la Pgp. Le comptage et la visualisation de l'intensité de fluorescence se faisaient en cytométrie de flux.

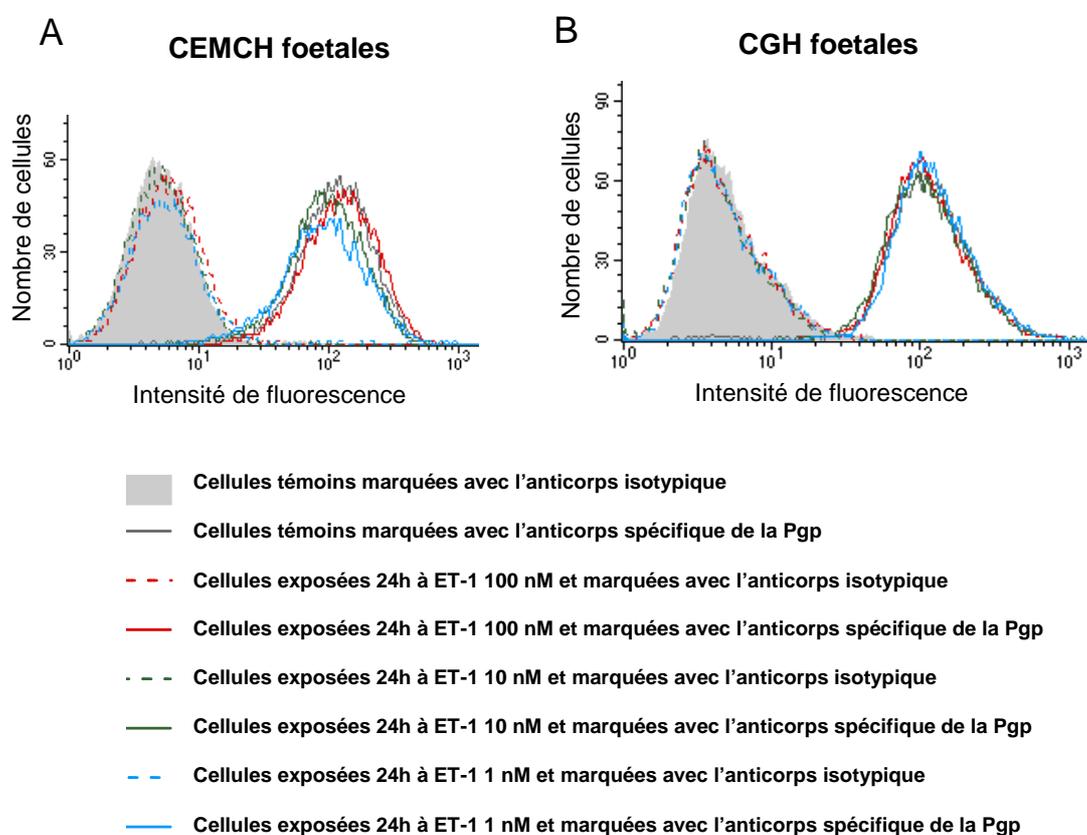


Figure 36 : Expression protéique totale de la Pgp, observée en cytométrie de flux, dans les CEMCH fœtales et les CGH fœtales d'un modèle *in vitro* humain de BHE exposé à ET-1 durant 24 heures (100 nM, 10 nM et 1 nM). Les cellules étaient perméabilisées, fixées et marquées avec un anticorps couplé à un fluorochrome, l'anticorps étant un contrôle isotypique ou un anticorps spécifique de la Pgp. **A-** Expression de la Pgp sur les CEMCH fœtales ; **B-** Expression de la Pgp sur les CGH fœtales.

Les résultats obtenus suggèrent que l'ET-1 ne module pas l'expression de la Pgp dans un modèle *in vitro* humain fœtal de BHE (figure 36).

- Effet d'ET-1 sur l'activité de la Pgp des BHE foetales

Nous avons souhaité regarder si l'ET-1 avait un effet sur l'activité de la Pgp de BHE foetales. Pour ce faire, nous avons évalué le passage de la digoxine radio-marquée afin de calculer le coefficient Q.

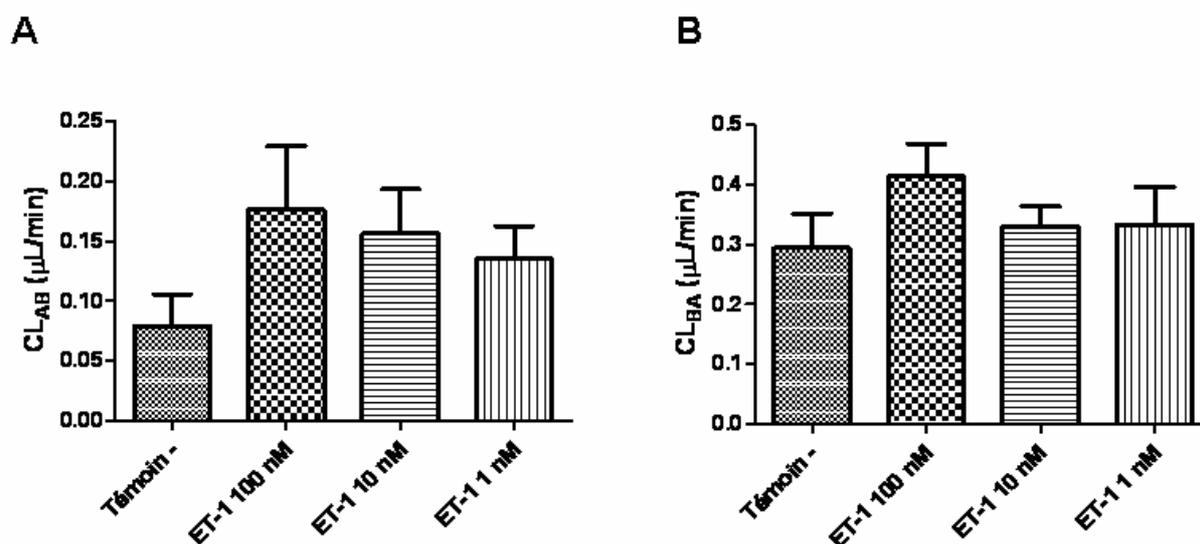


Figure 37 : Effet d'ET-1 sur l'activité de la Pgp des BHE de cellules foetales. Flux de A vers B et B vers A. Les BHE foetales étaient exposées 24 heures en apical à ET-1 (100 nM, 10 nM et 1 nM), puis le passage de la digoxine radiomarquée ³H, substrat spécifique de la Pgp, était évalué de B vers A et de A vers B. Les expériences furent réalisées trois fois, 3 à 6 BHE étant testées pour chaque passage (A vers B et B vers A) et ce, pour chaque condition. **A**- Passage de A vers B (CL_{AB}) de la digoxine ; **B**- Passage de B vers A (CL_{BA}) de la digoxine.

Concernant CL_{BA}, la Pgp semble plus efficace dans les BHE traitées que dans les non traitées (figure 37 B). Concernant CL_{AB}, la Pgp serait plus active dans les BHE témoins (qui efflueraient ainsi mieux la digoxine) que les traitées (figure 37 A). Cependant, aucun de ces résultats n'est significatif. Ci-après, les calculs du ratio Q permettant de considérer de façon globale l'activité de la Pgp en tenant compte des deux types de passages, A vers B et B vers A, vont dans ce sens.

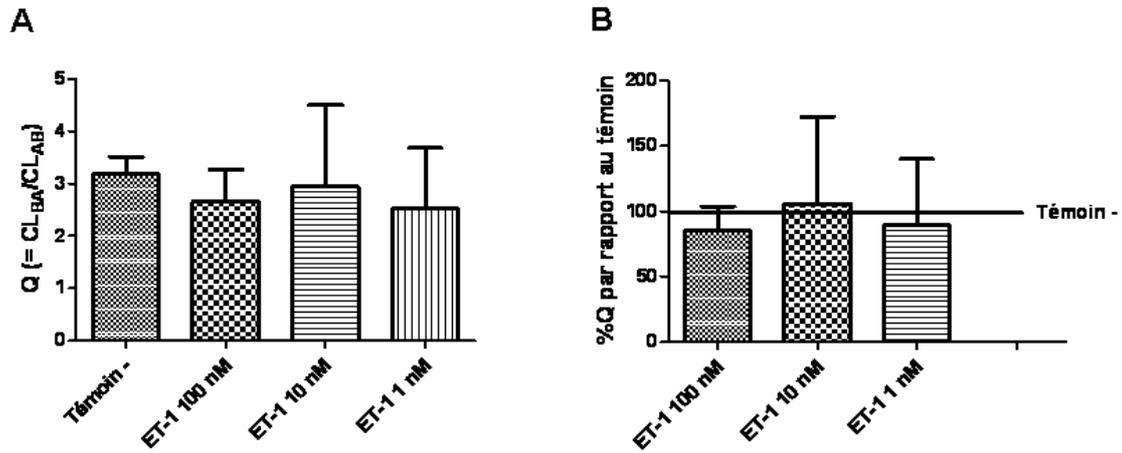


Figure 38 : Effet d'ET-1 sur l'activité de la Pgp des BHE de cellules fœtales. Ratios Q. Les BHE fœtales étaient exposées 24 heures en apical à ET-1 (100 nM, 10 nM et 1 nM), puis le passage de la digoxine radiomarquée ^3H , substrat spécifique de la Pgp, était évalué de B vers A et de A vers B. **A**- Moyenne des ratios $Q (= CL_{BA}/CL_{AB})$, un test statistique anova avec post-test de Newman-Keuls ayant été effectué ; **B**- Pourcentages des ratios Q par rapport au témoin ($\%Q = Q * 100 / Q_{\text{témoin}}$).

Les ratios Q sont supérieurs à 2, indiquant que les BHE fœtales sont polarisées (figure 38).

Un test Anova avec post test de Newman-Keuls donnait une valeur P supérieure à 0.9 pour les moyennes des Q (figure 38 A), indiquant qu'il n'y a aucun effet d'ET-1 sur l'activité de la Pgp des BHE humaines fœtales *in vitro*. Nous voyons sur le graphique représentant les pourcentages des Q par rapport au Q témoin (figure 38 B) que quelle que soit l'exposition à l'ET-1, nous restons dans des valeurs proches de celles du témoin. L'ET-1 ne modifie donc pas l'activité de la Pgp des CEMCH fœtales dans un modèle *in vitro* de BHE.

IV-C. 2- Effet sur le modèle adulte humain de BHE

- Effet sur l'expression de la Pgp des CEMCH

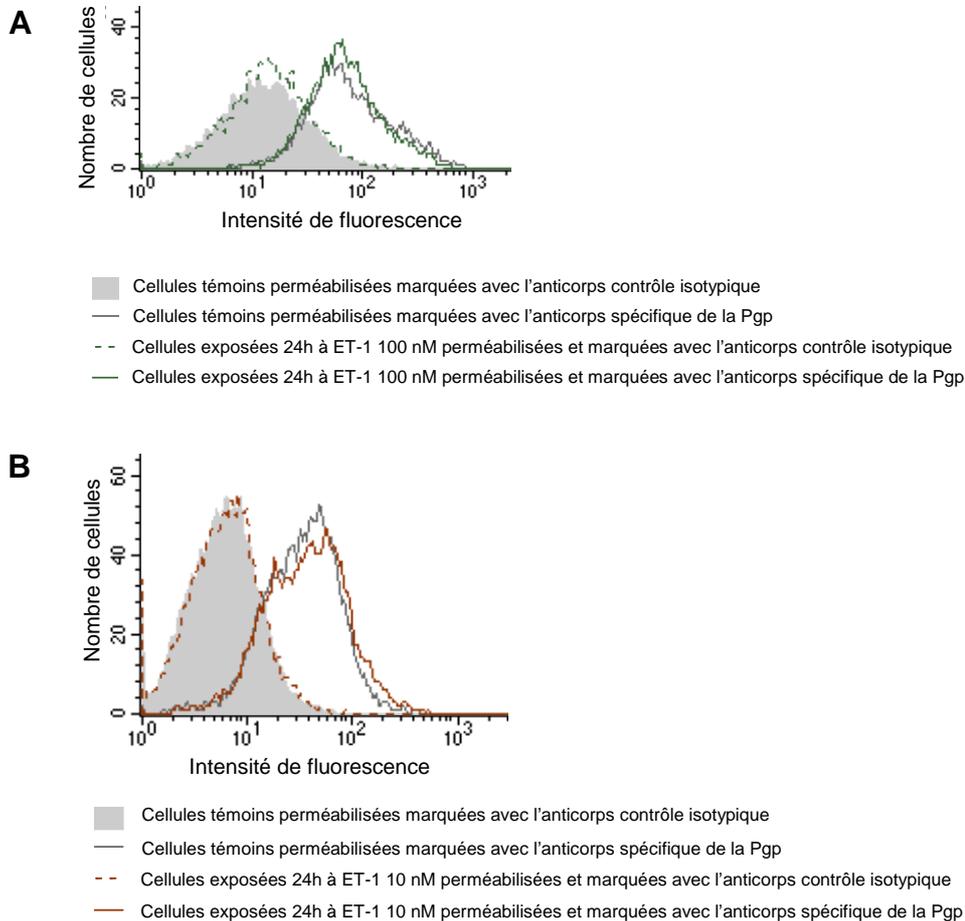


Figure 39 : Expression de la Pgp totale (membranaire et intracellulaire), observée en cytométrie de flux, dans les CEMCH adultes d'un modèle *in vitro* humain de BHE exposé à ET-1 durant 24 heures. Les cellules étaient perméabilisées avant fixation, et marquées avec un anticorps couplé à un fluorochrome, l'anticorps étant un contrôle isotypique ou un anticorps spécifique de la Pgp. Les expériences furent réalisées trois fois en duplicate sur les cellules provenant d'un patient. **A**- Expression de la Pgp sur les CEMCH adultes de BHE exposées 24h à 100 nM d'ET-1 ; **B**- Expression de la Pgp sur les CEMCH adultes de BHE exposées 24h à 10 nM d'ET-1.

Les courbes des contrôles isotypiques se superposent et permettent la comparaison de déplacements éventuels entre les courbes correspondant à l'anticorps spécifique de la Pgp. Ces courbes aussi se superposent et n'indiquent donc aucune modification de l'intensité de fluorescence, à savoir, qu'il n'y a pas de modification du nombre d'anticorps spécifiques de la Pgp se liant aux cellules (figure 39). L'ET-1 ne module pas l'expression de l'expression totale (membranaire et intracellulaire) de la Pgp des CEMCH adultes d'un modèle de BHE.

Si l'ET-1 n'a pas d'effet sur l'expression de la Pgp totale, peut-être influe-t-elle sur la quantité du transporteur présent au niveau de la membrane plasmique, et donc de sa localisation. Ainsi, les

expériences ont de nouveau été effectuées, mais les cellules ne furent pas perméabilisées avant fixation et marquage.

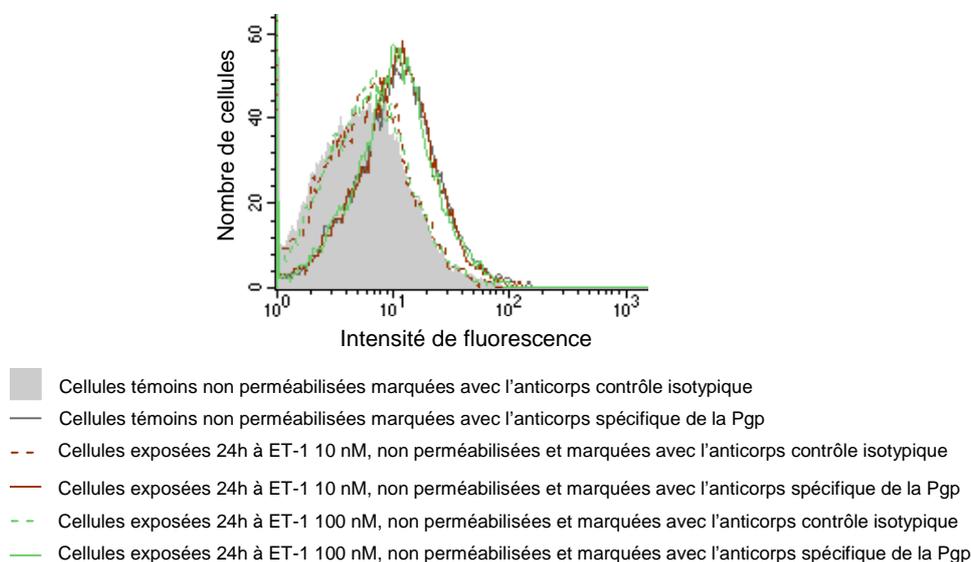


Figure 40 : Expression de la Pgp membranaire, observée en cytométrie de flux, dans les CEMCH adultes d'un modèle *in vitro* humain de BHE exposé à ET-1 durant 24 heures (100 nM et 10 nM). Les cellules (non perméabilisées) étaient marquées avec un anticorps couplé à un fluorochrome, l'anticorps étant un contrôle isotypique ou un anticorps spécifique de la Pgp. Les expériences furent réalisées deux fois en duplicate sur les cellules provenant d'un patient.

L'ET-1 ne module pas non plus la localisation membranaire de la Pgp sur les CEMCH adultes d'un modèle *in vitro* de BHE (figure 40). Rappelons que l'activité d'un transporteur n'est pas liée à son expression.

• Effet sur la fonctionnalité de la Pgp

Nous nous sommes ensuite attachés à regarder si l'ET-1 pouvait moduler l'activité de la Pgp dans un modèle *in vitro* adulte de BHE humaines. Pour se faire, nous avons évalué le passage de la digoxine après que les BHE ont été exposées 24 heures à 100 nM ou 10 nM d'ET-1.

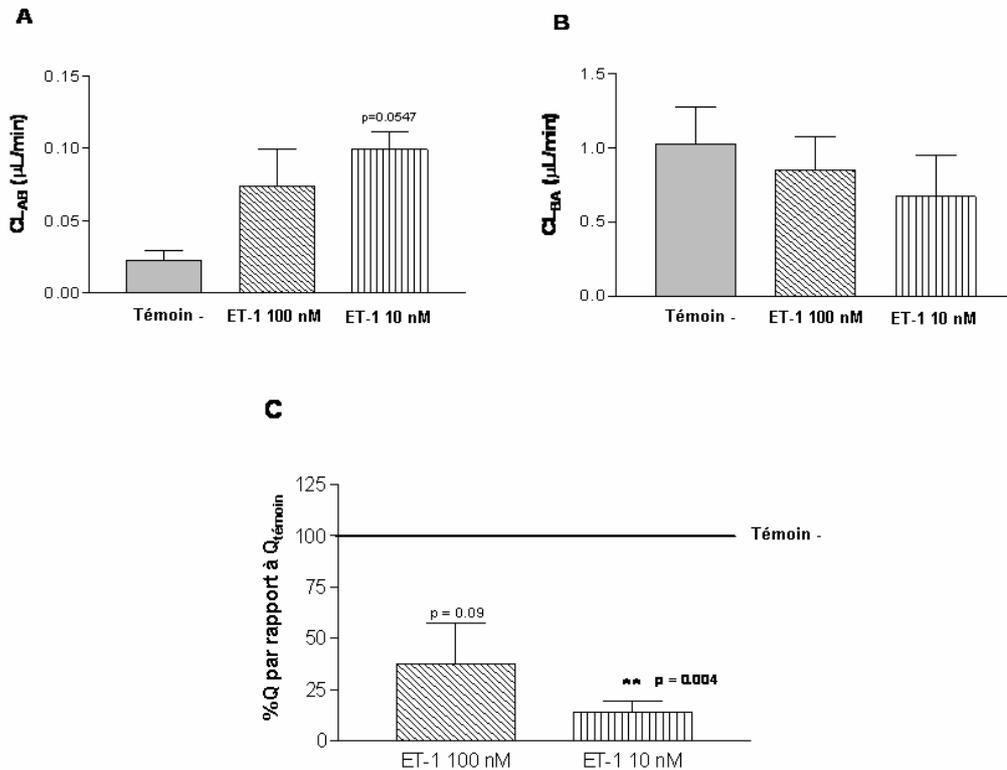


Figure 41 : Evaluation de l'activité de la Pgp sur les CEMCH adultes d'un modèle in vitro de BHE, via le passage de son substrat spécifique, la digoxine. Les BHE humaines adultes autologues étaient exposées à 10 nM ou 100 nM d'ET-1 en apical durant 24 heures. Les expériences furent réalisées sur les cellules provenant de trois patients, à chaque fois en quintuplicate pour chaque condition et chaque type de passage (A vers B ou B vers A). **A**- Flux de A vers B (CL_{AB}) de la digoxine radiomarquée (valeur P provenant d'un test bilatéral de Student); **B**- Flux de B vers A (CL_{BA}) de la digoxine radiomarquée ; **C**- Pourcentage du ratio Q par rapport au témoin ($\%Q = Q * 100 / Q_{\text{témoin}}$), Q correspondant à CL_{BA} / CL_{AB} . Un test bilatéral de Student avec variance inégale était effectué sur les pourcentages (Porcheray et al., 2005).

Nous remarquons que les BHE sont toujours polarisées en présence d'ET-1 (Q supérieur à 2), suggérant que l'effet observé est bien dû à l'activité de la Pgp.

Le flux de A vers B (CL_{AB}), soit du compartiment apical (correspondant à la lumière du capillaire sanguin *in vivo*) vers le compartiment basal (correspondant au SNC *in vivo*), augmente de 4 fois lors d'une exposition avec 10 nM d'ET-1 (figure 41 A). Cela signifie qu'après une exposition à l'ET-1, la Pgp est moins fonctionnelle et efflue moins efficacement le substrat vers A. Une plus grande proportion de digoxine radio-marquée passe ainsi en basal. Si ce résultat n'est pas significatif, il montre clairement une tendance puisque la valeur p est proche de 0,05. Le flux de B vers A (CL_{BA}) diminue, lui, de 0.35 fois comparé au témoin (figure 41 B). La Pgp est moins fonctionnelle, et peut donc moins bien contribuer au passage de la digoxine de B vers A.

Le ratio Q diminue significativement lorsque les BHE humaines adultes sont exposées à 10 nM d'ET-1 (valeur P de 0.004) (figure 41 C). Ainsi, $Q_{ET-1\ 10\ nM}$ représente 14% du témoin \pm SEM 4.4%, ce qui indique une diminution de 85% par rapport au témoin. Lors d'une exposition à 100 nM d'ET-1, les résultats ne sont pas significatifs, mais il y a bien une tendance (valeur P=0.09) avec $Q_{ET-1\ 100\ nM}$ représentant 37% du témoin \pm SEM 16%, soit une diminution de 63% par rapport au témoin.

Cette diminution de l'activité de la Pgp retranscrite par la diminution de Q est surtout due à l'augmentation du flux de A vers B, et à une légère diminution du flux de B vers A.

L'ET-1 n'a donc pas d'influence sur l'expression de la Pgp, mais elle induit une diminution de l'activité de la Pgp de la monocouche de CEMCH d'un modèle *in vitro* de BHE humaines adultes. Cette modulation de l'activité est la plus pertinente au regard de ses potentialités dans les thérapeutiques, puisque c'est en modulant l'activité du transporteur que l'on peut modifier l'efflux de certaines molécules, et donc la pénétration dans le SNC de médicaments.

IV-C. 3- Effet sur les cellules gliales humaines en monoculture

Comme l'ET-1 a une action autocrine, mais aussi paracrine, nous avons regardé si le peptide pouvait avoir un effet sur les cellules gliales en monoculture.

- Effet sur les cellules gliales adultes

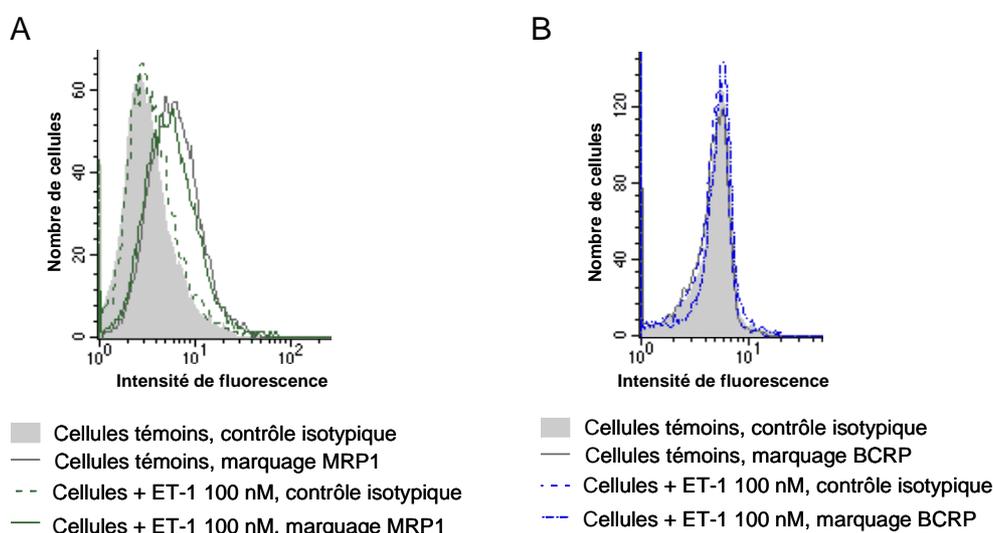


Figure 42 : Expression protéique totale de la MRP1 et de la BCRP (ou ABCG2) visualisée en cytométrie de flux sur des cellules gliales humaines adultes exposées 24 heures à 100 nM d'ET-1. Les cellules étaient perméabilisées, fixées et marquées avec un anticorps couplé à un fluorochrome, l'anticorps étant un contrôle isotypique ou un anticorps spécifique de l'un des transporteurs. Les résultats obtenus furent les mêmes sur deux à trois patients (selon le transporteur étudié), les expériences ayant été réalisées deux à trois fois en triplicata.

A- Expression de la MRP1 ; B- Expression de la BCRP (ou ABCG2).

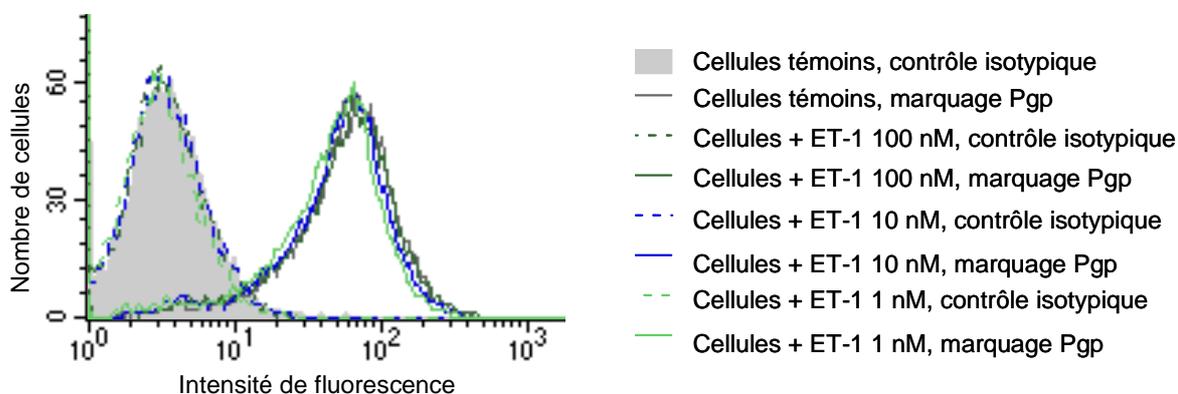


Figure 43 : Expression protéique totale de la Pgp visualisée en cytométrie de flux sur des cellules gliales humaines adultes exposées 24 heures à différentes concentrations d'ET-1 (100 nM, 10 nM et 1 nM). Les cellules étaient perméabilisées, fixées et marquées avec un anticorps couplé à un fluorochrome, l'anticorps étant un contrôle isotypique ou un anticorps spécifique de la Pgp. Les résultats obtenus furent les mêmes sur deux à trois patients (selon le transporteur étudié), les expériences ayant été réalisées deux à trois fois en triplicate.

L'ET-1 n'a pas d'effet sur l'expression protéique de la Pgp (figure 43), de la MRP ou de la BCRP (ABCG2) (figure 42) de cellules gliales adultes en monoculture.

IV-C. 4- Mécanismes impliqués dans la modulation de la Pgp par l'ET-1 dans le modèle adulte de BHE humaine

L'ET-1 diminue l'activité de la Pgp dans un modèle *in vitro* humain adulte de BHE. Ce résultat conduit naturellement à se demander quel est le récepteur à l'ET-1 impliqué, ET_A ou ET_B ? Afin d'y répondre, nous avons de nouveau exposé des BHE humaines adultes *in vitro* à l'ET-1, mais cette fois-ci en présence ou non d'antagonistes aux récepteurs ET_A et ET_B.

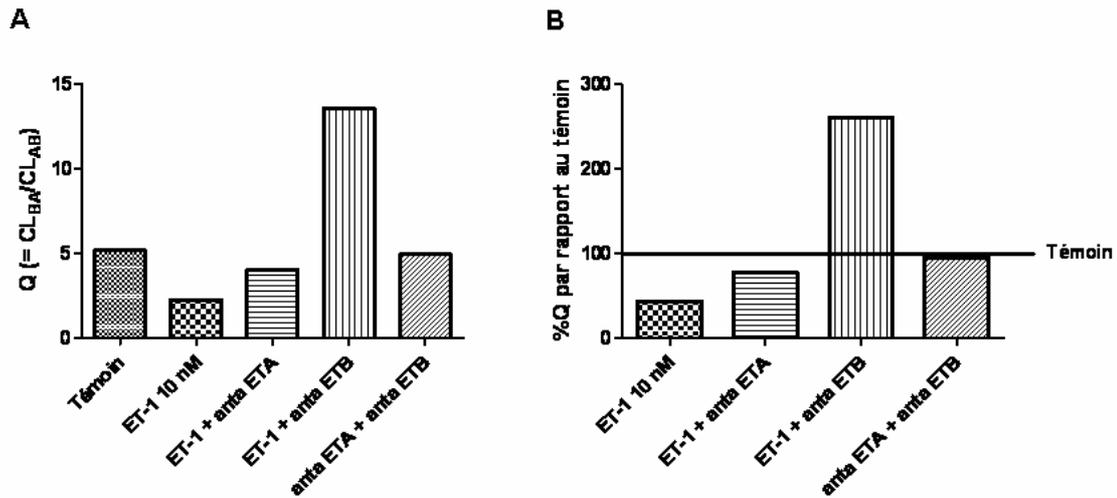


Figure 44 : Effet d'ET-1 sur l'activité de la Pgp des BHE humaines adultes *in vitro* en présence d'antagonistes aux récepteurs. Les BHE adultes étaient exposées 24 heures en apical à ET-1 10 nM en présence ou non de 100 nM d'antagonistes au récepteur ET_A (anta ETA) ou de 100 nM d'antagonistes au récepteur ET_B (anti ETB), les BHE témoins n'étant exposées à aucun des composés, et certaines BHE étant exposées seulement aux deux antagonistes en absence d'ET-1. Puis le passage de la digoxine radiomarquée ³H, substrat spécifique de la Pgp, était évalué de B vers A et de A vers B. Expériences réalisées une seule fois en quadruplicate sur un seul patient.
A- Moyenne des ratios $Q (= CL_{BA}/CL_{AB})$; **B**- Pourcentages des ratios Q par rapport au témoin ($\%Q = Q * 100 / Q_{\text{témoin}}$).

Ces résultats (figure 44) montrent tout d'abord que les antagonistes aux récepteurs seuls, en l'absence d'ET-1, n'ont pas d'effet sur le passage de la digoxine, puisque le ratio Q est alors du niveau de celui du témoin ($Q_{\text{anta ETA} + \text{anta ETB}} = 95.2\%$ par rapport au témoin). Nous observons bien, comme nous l'avons déjà démontré, une diminution de l'activité de la Pgp avec la présence durant 24 heures de 10 nM d'ET-1. Lorsqu'on ajoute, en plus d'ET-1, l'antagoniste au récepteur ET_A, le niveau du ratio Q tend à augmenter pour se rapprocher de celui du témoin ($Q_{\text{ET-1} + \text{anta ETA}} = 77.3\%$ par rapport au témoin), bien qu'il reste inférieur encore de 22.7 %. Ceci indique qu'une partie d'ET-1 agit via ET_A. Lorsqu'on ajoute, en plus d'ET-1, l'antagoniste au récepteur ET_B, le niveau du ratio Q augmente et devient 2.61 fois supérieur à celui du témoin ($\%Q_{\text{ET-1} + \text{anta ETB}} = 261\%$ par rapport au Q témoin). Ceci indique que la majorité d'ET-1 agirait via ET_B.

IV-C. 5- Conclusion concernant l'effet d'ET-1 sur la Pgp

L'ET-1 ne module ni l'expression ni l'activité de la Pgp de BHE humaines fœtales *in vitro*. Si elle n'influence pas non plus l'expression de la Pgp de BHE humaines adultes *in vitro*, elle diminue en revanche son activité, et ce principalement via le récepteur ET_B.

Ces résultats questionnent ainsi sur les différences de thérapeutiques entre l'adulte et le fœtus dans un contexte de neuro-inflammation. En effet, l'ET-1 libérée par la neuro-inflammation pourrait-elle faciliter le passage des médicaments dans le SNC adulte, et n'avoir pas d'effet sur ce plan chez le fœtus ? Les voies de signalisation sont-elles différentes chez l'adulte et le pré-natal ?

IV-E. Effet de l'ET-1 sur la neuro-inflammation

IV-E. 1- Effet d'ET-1 sur la sécrétion de MCP-1 dans un modèle adulte de BHE humaine

La MCP-1 est une chimiokine importante dans la neuro-inflammation. Elle participe au recrutement leucocytaire. De plus, la sécrétion de MCP-1 est souvent associée à celle d'ET-1 *in vivo*, et, *in vitro*, les cellules endothéliales cérébrales et astrocytaires exposées à l'ET-1 ou un antagoniste de ses récepteurs sécrètent de la MCP-1. Nous avons regardé si l'ET-1 induisait la sécrétion de MCP-1 dans un modèle humain adulte de BHE *in vitro*.

- Effet sur la sécrétion de MCP-1 en basal

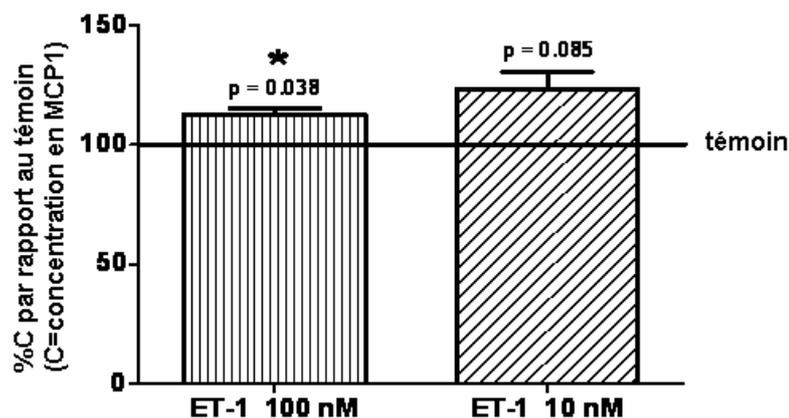


Figure 45 : Modulation de la concentration de MCP-1 secrété dans le compartiment basal d'un modèle *in vitro* humain adulte de BHE exposé à ET-1. Les BHE autologues humaines adultes étaient exposées à 10 nM ou 100 nM d'ET-1 en apical durant 24 heures. Les expériences furent réalisées sur les cellules provenant de trois patients, déterminées. Des tests ELISA furent ensuite réalisés sur 6 surnageants basaux par conditions. Un test de Dixon était effectué pour éliminer les valeurs aberrantes. En raison d'une forte variabilité inter-patients, les résultats sont exprimés en pourcentages de la modulation des concentrations (C) de MCP-1 par rapport à la concentration des témoins ($\%C = C_{ET-1} * 100 / C_{témoin}$). Un test bilatéral de student avec variances inégales a été réalisé sur ces pourcentages (Porcheray et al., 2005).

L'expression basale de MCP-1 se situait entre 1 et 50 ng/mL selon les patients, avec une moyenne sur les trois patients de 23 ng/mL. Les BHE *in vitro* exposées durant 24 heures à 100 nM d'ET-1 en apical voyaient leur concentration basale de MCP-1 augmenter significativement de 12% ($C_{ET-1\ 100\ nM} = 112.8\%$ du témoin \pm SEM 4.2%, valeur P = 0.038) (figure 45). Lors d'une exposition à 10 nM d'ET-1, la concentration de MCP-1 en basal était encore supérieure ($C_{ET-1\ 10\ nM} = 123.3\%$ du témoin \pm SEM 5.9%, valeur P = 0.085) mais les résultats n'étaient pas significatifs. Cependant, la valeur P étant comprise entre 0.05 et 0.1, ces résultats montrent clairement une tendance à l'augmentation. L'ET-1 induit donc une sécrétion de MCP-1 dans le compartiment basal de BHE humaines adultes *in vitro*.

- **Quel récepteur à l'ET-1 est impliqué dans la sécrétion de MCP-1 en basal ?**

Nous nous sommes demandé quel était le récepteur à l'endothéline impliqué. Nous avons regardé les modulations de la concentration en MCP1 du compartiment basal de BHE *in vitro* humaines adultes exposées à 10 nM d'ET-1 durant 24 heures en présence soit de 100 nM d'antagoniste au récepteur ET_A, soit de 100 nM d'antagoniste au récepteur ET_B. Les BHE contrôles n'étaient exposées à aucun de ces composés, tandis que d'autres BHE étaient soumises aux deux antagonistes à la fois, en l'absence d'ET-1.

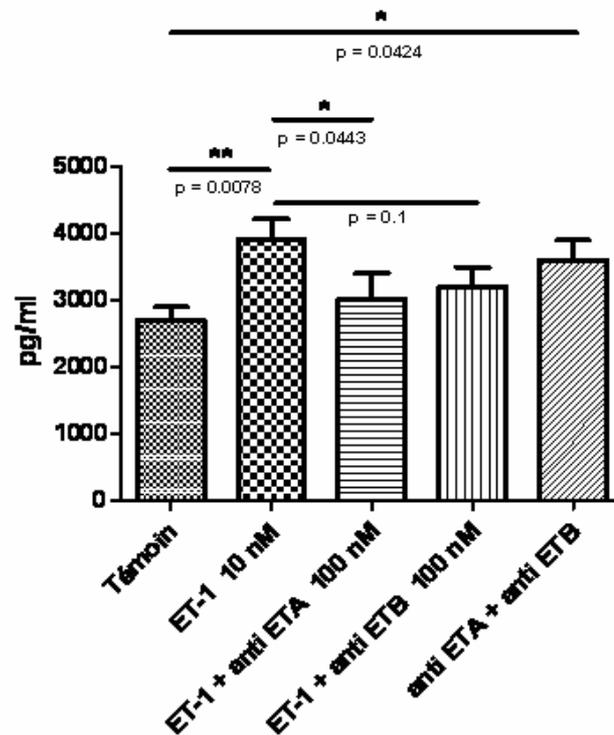


Figure 46 : Effet des antagonistes aux récepteurs ET_A et ET_B sur la modulation de la sécrétion de MCP-1 dans le compartiment basal de BHE *in vitro* humaines adultes exposées à ET-1. Les BHE furent exposées 24 heures à ET-1 10 nM en apical, en présence ou non soit de 100 nM d'antagoniste au récepteur ET_A, soit de 100 nM d'antagoniste au récepteur ET_B. Certaines BHE furent exposées aux deux antagonistes à la fois en l'absence d'ET-1. Les BHE furent ici réalisées avec les cellules d'un seul et même patient. Huit surnageants basaux par condition furent soumis à un ELISA en duplicate. Les surnageants basaux furent ensuite récoltés et soumis à des ELISA pour le dosage de MCP-1. Les concentrations sont ici représentées en pg/mL. Un test de comparaison multiple de Newman-Keuls donna une valeur P globale de 0.056. La comparaison de chaque condition et la détermination de différentes valeurs P fut obtenue par la Procédure GLM/Least square means (algorithme des moyennes quadratiques minimales).

Les deux antagonistes d'ET_A et ET_B induisent une diminution de l'induction de la sécrétion de MCP-1 par ET-1 (3899 ± SEM 289 pg/ml pour ET-1 seul ; 3013 ± SEM 361 pg/ml en présence de l'antagoniste d'ET_A et 3188 ± SEM 273 pg/ml en présence de l'antagoniste d'ET_B) (figure 46). Cependant, seule la diminution engendrée par l'antagoniste d'ET_A était significative comparée à la concentration en présence d'ET-1 seul (valeur P = 0.0443). Ainsi, l'action d'ET-1 semble en grande part médiée par le récepteur ET_A, mais nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse qu'une partie de l'effet provienne aussi de l'action d'ET-1 sur ET_B, dans la mesure où lorsque l'antagoniste d'ET_A est présent, nous ne retrouvons pas le niveau basal de sécrétion. D'ailleurs,

lorsque l'antagoniste d' ET_B est présent avec ET-1, il y a une tendance, même si elle n'est pas significative, à la diminution de la sécrétion de MCP-1 en basal (valeur $p = 0.1$). Nous remarquons que les antagonistes seuls, en l'absence d'ET-1, donne une augmentation de la concentration de MCP1 significative ($3594 \pm SEM 246$ pg/mL ; valeur $p = 0.0424$) bien qu'elle n'atteigne pas le niveau de la concentration engendrée par ET-1. Cela pourrait indiquer qu'à un niveau basal, l'ET-1, via ses récepteurs, régule négativement la sécrétion de MCP-1. Une autre hypothèse serait que l'un ou l'autre des antagonistes, ou les deux, agissent sur une autre voie de signalisation.

• Sécrétion de MCP-1 en apical

Nous avons regardé succinctement les concentrations de MCP-1 sécrété en apical dans ces mêmes expériences.

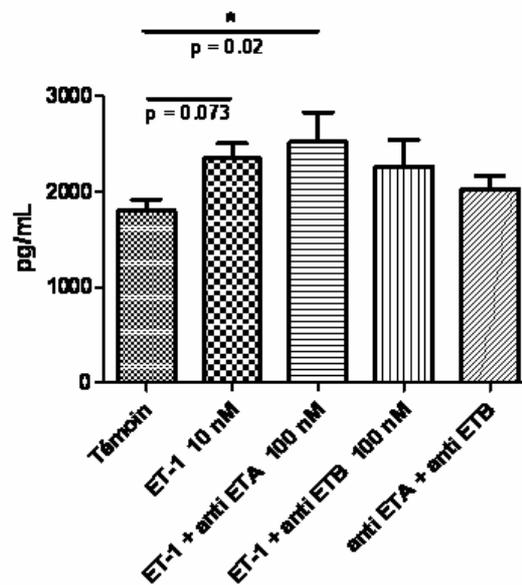


Figure 47 : Effet des antagonistes aux récepteurs ET_A et ET_B sur la modulation de la sécrétion de MCP-1 dans le compartiment apical de BHE in vitro humaines adultes exposées à ET-1. Les BHE furent exposées 24 heures à ET-1 10 nM en apical, en présence ou non soit de 100 nM d'antagoniste au récepteur ET_A , soit de 100 nM d'antagoniste au récepteur ET_B . Certaines BHE furent exposées aux deux antagonistes à la fois en l'absence d'ET-1. Les surnageants apicaux furent ensuite récoltés et soumis à des ELISA pour le dosage de MCP1. Les concentrations sont ici représentées en pg/mL. Un test de comparaison multiple Anova donna une valeur P globale de 0.16. La comparaison de chaque condition et la détermination de différentes valeurs P fut obtenue par la Procédure GLM/Least square means (algorithme des moyennes quadratiques minimales).

ET-1 induit une tendance à l'augmentation de la sécrétion de MCP-1 en apical (valeur $P = 0.073$) dont la sécrétion passe en moyenne de $1798 \pm SEM 119$ pg/mL à $2341 \pm SEM 158$ pg/mL (figure 47). En présence de l'antagoniste d' ET_A , la concentration de MCP-1 en apical était significativement augmentée (valeur $P = 0.02$) passant d'une moyenne de $1798 \pm SEM 119$ pg/mL pour les cellules témoins à $2515 \pm SEM 309$ pg/mL. En présence de l'antagoniste ET_B , la concentration de MCP-1 sécrété ($2260 \pm SEM 276$ pg/mL) était inférieure à celle en présence d'ET-1 seul, et était non significativement différente de la concentration en apical des BHE témoins (valeur $P = 0.15$). Les deux antagonistes, en l'absence d'ET-1, donnaient une concentration plus faible qu'en présence d'ET-1 (avec ou sans antagonistes), et significativement proche de la concentration des BHE témoins (valeur $P = 0.5$). Ainsi, on peut supposer que la tendance à l'augmentation de la sécrétion de MCP-1 en apical des BHE exposées 24 heures à ET-1 est due au récepteur ET_B .

On peut imaginer que si cette augmentation est plus importante avec un antagoniste d'ET_A, cela pourrait éventuellement s'expliquer en avançant l'hypothèse qu'ET_A régulerait négativement ET_B pour cette voie de signalisation ; ainsi, si ET_A ne fonctionne pas, ET_B induit une sécrétion d'autant plus importante de MCP-1.

Dosage de MCP-1 dans les surnageants de cellules gliales en monoculture :

Un dosage ELISA de MCP1 dans les surnageants d'astrocytes fœtaux humains exposés durant 24 heures à 10 nM et 100 nM d'ET-1 donnaient des résultats préliminaires semblant indiquer une sécrétion de MCP1 (20% d'augmentation).

• Conclusion concernant la sécrétion de MCP-1

L'ET-1 induit une sécrétion significative de MCP-1 en basal de BHE humaines *in vitro*, essentiellement via le récepteur ET_A, et une sécrétion en apical via ET_B.

Il est probable que le niveau constitutif d'ET-1 induise une régulation de la sécrétion basale de MCP-1. Cette régulation disparaît en présence des deux antagonistes aux récepteurs ET_A et ET_B, conduisant à une augmentation significative de la sécrétion de MCP-1 en basal.

IV-E. 2- Effet d'ET-1 sur la sécrétion d'IL-8 dans un modèle adulte de BHE humaine

L'IL-8 est une autre chimiokine très importante dans les phénomènes inflammatoires. Elle est, tout comme MCP-1, un puissant attracteur de leucocytes. L'ET-1, dans des monocultures de cellules cérébrales humaines, induit la sécrétion d'IL-8. Nous avons cherché à savoir ce qu'il en était au niveau d'un modèle humain adulte de BHE.

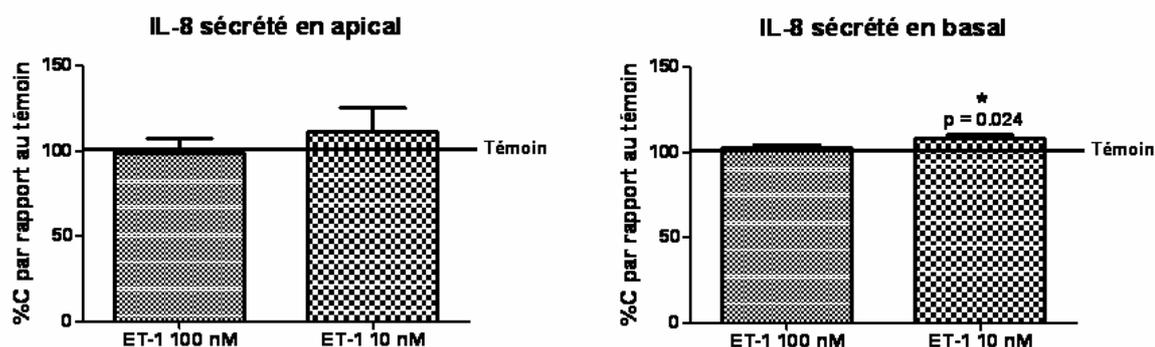


Figure 48 : Modulation de la concentration d'IL-8 secrétée dans le compartiment apical ou basal d'un modèle *in vitro* humain adulte de BHE exposé à ET-1. Les BHE autologues humaines adultes étaient exposées à 10 nM ou 100 nM d'ET-1 en apical durant 24 heures. Des tests BIOPLEX étaient ensuite réalisés sur les surnageants.

Un test de Dixon était effectué pour éliminer les valeurs aberrantes. En raison d'une forte variabilité inter-patients, les résultats sont exprimés en pourcentages de la modulation des concentrations (C) de cytokines par rapport à la concentration des témoins ($\%C = C_{ET-1} * 100 / C_{\text{témoin}}$). Un test bilatéral de student avec variances inégales a été réalisé sur ces pourcentages (Porcheray et al., 2005). **IL-8 sécrété en apical**, les résultats proviennent de l'analyse de 3 patients et 3 surnageants par condition ; **IL-8 sécrété en basal**, les résultats proviennent de l'analyse de 3 patients et 5 surnageants par condition.

L'ET-1 à 10 nM induit une augmentation significative de la sécrétion d'IL-8 en basal de BHE humaines adultes ($\%C_{ET-1\ 10\ nM} = 107 \pm SEM\ 2.4\%$; valeur $p = 0.024$) (figure 48).

IV-E. 3- Effet d'ET-1 sur la sécrétion d'IL-6 dans un modèle adulte de BHE humaine

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire. Elle a été montrée comme régulant certains transporteurs ABC comme la Pgp. Certaines cellules humaines stimulées par l'ET-1 sécrètent de l'IL-6. Nous avons ainsi cherché à connaître l'effet de l'ET-1 sur la sécrétion de cette cytokine dans un modèle de BHE humaine.

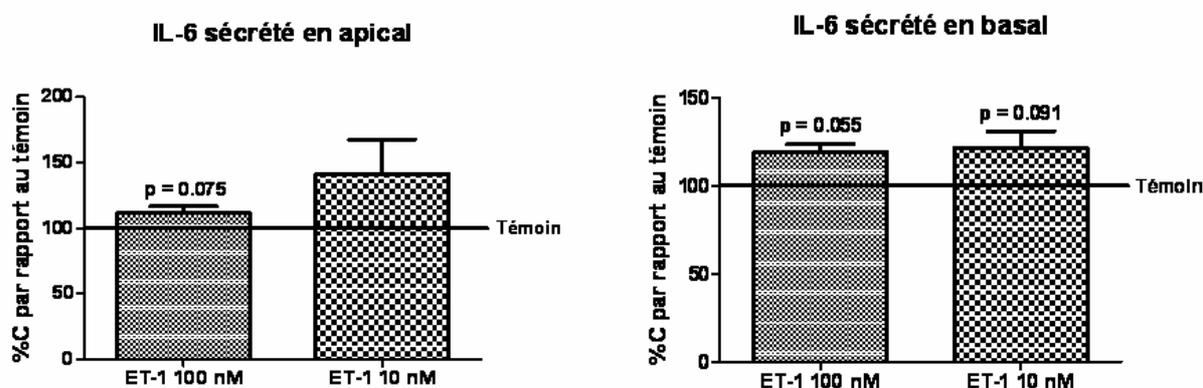


Figure 49 : Modulation de la concentration d'IL-6 sécrétée dans le compartiment apical ou basal d'un modèle in vitro humain adulte de BHE exposé à ET-1. Les BHE autologues humaines adultes étaient exposées à 10 nM ou 100 nM d'ET-1 en apical durant 24 heures. Des tests BIOPLEX étaient ensuite réalisés sur les surnageants.

Un test de Dixon était effectué pour éliminer les valeurs aberrantes. En raison d'une forte variabilité inter-patients, les résultats sont exprimés en pourcentages de la modulation des concentrations (C) de cytokines par rapport à la concentration des témoins ($\%C = C_{ET-1} * 100 / C_{\text{témoin}}$). Un test bilatéral de student avec variances inégales a été réalisé sur ces pourcentages (Porcheray et al., 2005). **IL-6 sécrété en apical**, les résultats proviennent de l'analyse de 3 patients et 6 surnageants par condition ; **IL-6 sécrété en basal**, les résultats proviennent de l'analyse de 3 patients et 5 (pour ET-1 10 nM) et 3 (pour ET-1 100nM) surnageants par condition.

L'ET-1 induit une tendance à l'augmentation d'IL-6 en apical ($\%C_{ET-1\ 100\ nM} = 111.7 \pm SEM\ 5.3\%$; valeur $P = 0.075$) et en basal ($\%C_{ET-1\ 100\ nM} = 119.4 \pm SEM\ 3.9\%$; valeur $P = 0.055$ et $\%C_{ET-1\ 10\ nM} = 121.7 \pm SEM\ 8.8\%$; valeur $P = 0.091$) (figure 49).

Il est à noter que le dosage des cytokines IL-6, et IL-8 en Bioplex, et de MCP-1 en ELISA se faisait à partir des mêmes surnageants cellulaires.

IV-E. 4- Effet d'ET-1 sur la sécrétion de MMP

Les MMP aident à la migration des leucocytes dans le SNC lors de la neuro-inflammation. De plus, l'ET-1 induit la sécrétion de certaines MMP par certaines cellules humaines. Nous avons cherché à savoir si l'ET-1 avait un effet sur la sécrétion de certaines MMP.

Après analyse en ELISA de la quantité de MMP3 et MMP9 dans les surnageants basaux de BHE humaines adultes exposées *in vitro* à l'ET-1 durant 24 heures, aucune modulation n'a été détectée.

V- DISCUSSION

Nos travaux ont porté sur l'étude de l'effet de l'endothéline 1 (ET-1) appliquée à des modèles autologues *in vitro* humains de barrière héméto-encéphalique (BHE). Les cellules employées proviennent d'individus et ne sont donc pas des cellules en lignées (ne reflétant en rien la réalité physiologique). Nous avons vérifié qu'elles exprimaient la P-glycoprotéine (Pgp), le transporteur d'efflux que nous souhaitons le plus largement étudier. Pour ce qui concerne la MRP1 et l'ABCG2 (ou BCRP), nous avons déjà formulé des hypothèses dans la partie 'Résultats' concernant leur faible expression ou leur absence d'expression. Dans la littérature il est stipulé que les cellules voient leur expression de MRP1 se modifier selon les types cellulaires en présence. Par exemple, des cellules endothéliales cérébrales immortalisées de rat voyaient l'expression de leur MRP1 diminuer lors de leur mise en co-culture avec des astrocytes (Regina et al., 1998). L'expression en ARNm ou en protéines des transporteurs ABC dépend du modèle utilisé. Ainsi, *mdr1b* n'est pas détectable *in vivo* sur la BHE (Schinkel et al., 1995) alors qu'il peut être exprimé par des cellules en culture (Barrand et al., 1995). Ainsi, il est probable que la mise en culture des cellules est eu un impact sur l'expression de ces deux transporteurs.

Les deux modèles étudiés, adulte et fœtal, possédaient une bonne intégrité de la monocouche de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (CEMCH) puisque le sucrose ne traversait que très peu cette barrière, indiquant un faible passage para-cellulaire et des jonctions serrées fonctionnelles.

V-A. Comparaison des modèles *in vitro* adultes et fœtaux de BHE humaines :

Les deux modèles, adulte et fœtal, possédaient des barrières faiblement perméables au sucrose (inférieur à $0.2 \pm \text{SEM } 0,013 \mu\text{L}/\text{min}$, soit inférieur à $3.3 \times 10^{-6} \pm \text{SEM } 0,022 \times 10^{-6} \text{ cm}/\text{sec}$), ce qui implique un très faible passage para-cellulaire et donc des jonctions serrées fonctionnelles. Les deux modèles sont largement reproductibles puisque l'on observe une très faible SEM (SEM environ égale à 6.5 % de la valeur de la moyenne). Les deux types de BHE étaient également polarisés puisque le ratio Q était supérieur à 2 dans les deux cas.

Nous avons donc étudié l'effet de l'ET-1 sur ces deux types de modèle *in vitro* humain de BHE. Tous deux ne répondent pas de la même façon à cette exposition puisque l'ET-1 n'a pas d'effet sur les BHE fœtales. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées sur cette différence.

La première concerne la co-culture. Dans le modèle adulte, les CEMCH sont cultivées en présence de cellules gliales, à savoir un mélange de cellules comprenant des astrocytes, des précurseurs microgliaux, des péricytes -que nous assimilons exceptionnellement aux cellules gliales en raison de leur marquage NG2 et de leur apport dans l'induction des propriétés de la BHE (Dohgu et al., 2005; Hayashi et al., 2004; Hori et al., 2004) et quelques cellules microgliales. Dans le modèle fœtal, les CEMCH ne sont cultivées qu'en présence d'astrocytes. Ainsi, il est possible que les astrocytes seuls ne permettent pas l'induction de toutes les propriétés de la BHE (jonction serrées, transporteurs...), ceci allant dans le sens des travaux de Nakagawa et al. (2007) qui montraient qu'une co-culture en présence d'astrocytes et de péricytes favorisait l'étanchéité de la BHE. Nos résultats sur le passage du sucrose confirment d'ailleurs les résultats de cette équipe,

puisque nous trouvons une tendance statistique confirmant que les BHE adultes sont légèrement moins perméables au sucrose que les BHE fœtales.

La deuxième hypothèse qui pourrait expliquer les différences entre le modèle fœtal et adulte serait tout simplement que les CEMCH fœtales et adultes n'auraient pas les mêmes propriétés *in vitro* et *in vivo*. Plusieurs travaux vont dans ce sens. Une étude chez le mouton *in vivo* avait d'ailleurs souligné que le passage du sucrose à travers la BHE était bien plus important chez de jeunes fœtus que chez des nouveaux nés (Evans et al., 1974). Chez le rat, il a été observé une diminution de l'influx de potassium avec le développement cérébral, notamment lors d'une comparaison entre le fœtus et le nouveau né (Keep et al., 1995).

V-B. Effet de l'ET-1 sur l'activité de la Pgp

L'activité de la Pgp est importante à connaître, puisqu'elle contrôle le passage des molécules thérapeutiques dans le SNC. Plus la Pgp est active, moins les médicaments pénétreront dans le SNC.

V-B. 1- Les hypothèses découlant de nos résultats

Nous avons montré que l'ET-1 induisait une diminution de l'activité de la Pgp présente sur la monocouche de CEMCH d'un modèle *in vitro* de BHE humaines adultes. D'après des résultats préliminaires, il semble que l'action d'ET-1 se fasse principalement via ET_B, bien qu'un antagoniste au récepteur ET_A puisse en partie induire une réponse proche de celle des cellules contrôles. Ce qui intrigue est que le passage global de la digoxine en présence d'un antagoniste au récepteur ET_B ($Q_{ET-1 + anta_{ETB}}$) est supérieur au $Q_{contrôle}$, impliquant une activité plus élevée de la Pgp.

Une première hypothèse serait que l'antagoniste au récepteur ET_B non seulement empêcherait l'action de l'ET-1 ajouté en apical, mais peut-être également de l'ET-1 endogène présent à un niveau basal dans le modèle BHE.

Une autre hypothèse serait que le récepteur ET_B régulerait négativement la voie de régulation positive de la Pgp effectuée par le récepteur ET_A, tandis que le récepteur ET_A régulerait positivement ET_B ainsi que l'activité de la Pgp. En l'absence de la régulation négative due à l'antagoniste au récepteur ET_B, il en résulterait une augmentation de l'activité de la Pgp. En l'absence de la régulation positive due à l'antagoniste au récepteur ET_A, la voie empruntant ET_B ne serait activée que d'une moindre façon ce qui produirait une diminution plus faible de l'activité de la Pgp (figure 50).

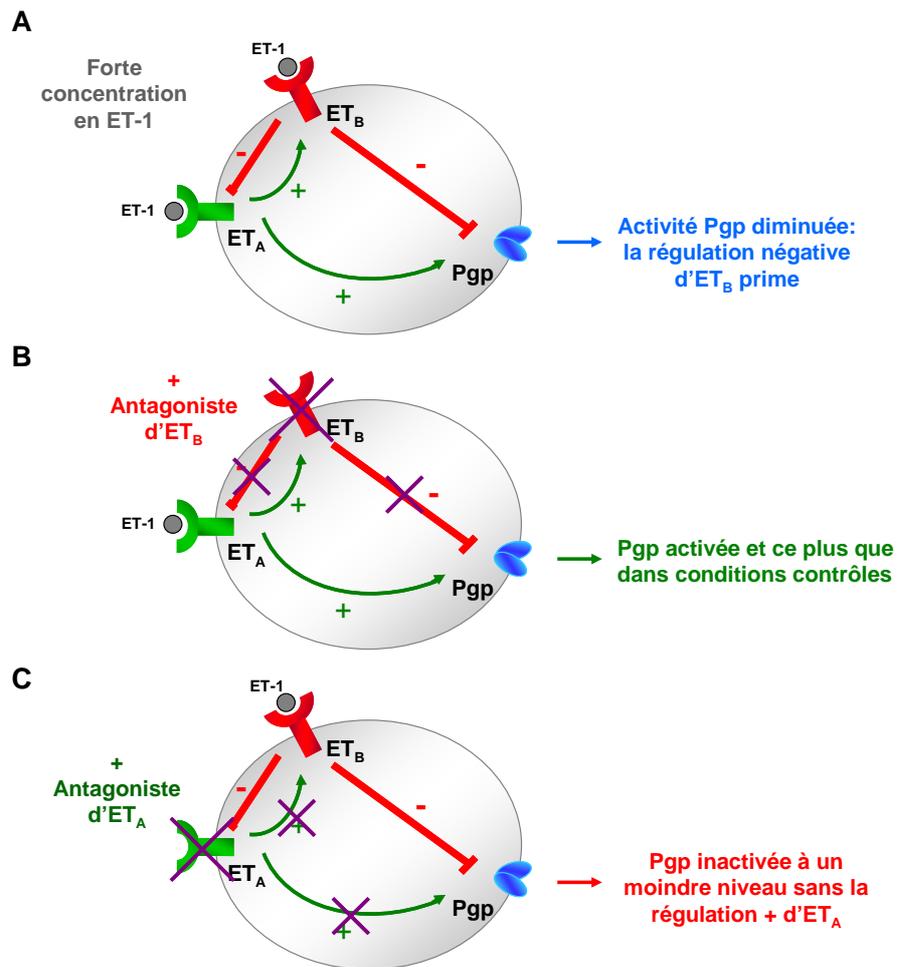


Figure 50 : Schématisation d'une hypothèse sur le rôle des récepteurs à l'ET-1 dans l'activité de la Pgp des CEMCH adultes d'un modèle in vitro de BHE. **A-** L'exposition à de fortes concentrations en ET-1 durant 24 heures provoque une diminution de l'activité de la Pgp, la signalisation via ET_B primant ; **B-** Dans les mêmes conditions, mais en présence d'un antagoniste au récepteur ET_B, la régulation positive via ET_A apparaît et induit une augmentation de l'activité de la Pgp supérieure à celle observée dans les conditions contrôles ; **C-** Toujours en présence de fortes concentrations d'ET-1, mais également en présence d'un antagoniste au récepteur ET_A, le peptide induit une régulation négative de la Pgp via ET_B, mais cette diminution de l'activité est moindre qu'en présence du récepteur ET_A fonctionnel, puisqu'il n'y a plus la régulation positive d'ET_B engendrée par ET_A.

Certaines données de la littérature appuient cette hypothèse de dualité de l'axe à l'endothéline, puisque si une voie est activée par l'un des récepteurs à l'ET-1, l'autre récepteur est souvent impliqué dans la voie contraire. Ainsi, ET_B dans des cultures de cellules hépatiques humaines semble intervenir dans l'inhibition de la croissance cellulaire (Mallat et al., 1996), tandis que dans les cellules épithéliales intestinales de rat, le récepteur ET_A intervient dans l'induction de la croissance cellulaire (Shigematsu et al., 1998). ET-1 agit également sur l'apoptose par le biais du récepteur ET_B, (Dong et al., 2005), la survie cellulaire étant, elle, engagée via le récepteur ET_A (Pflug et al., 2007).

Une troisième hypothèse viserait à se questionner quant à l'affinité d'ET-1 pour ses deux récepteurs. La constante de dissociation d'ET-1 pour les deux récepteurs ET_A et ET_B semble être

la même et avoisiner les 0.07 nM dans les cellules de la vésicule biliaire humaine (Huang et al., 2001b), et est, au plus haut, décrite à 0.5 nM (Johnstrom et al., 2005). Peut-être cette constante diffère-t-elle au niveau des CEMCH. Nous devons cependant garder à l'esprit que dans nos conditions expérimentales, la concentration d'ET-1 pour l'étude de son effet, à savoir 10 nM et 100 nM, est très largement supérieure à la constante de dissociation, impliquant une probable saturation des récepteurs. Peut-être, en revanche, est-ce la quantité des deux récepteurs au niveau des cellules en culture qui n'est pas équivalente, l'un d'eux pouvant être beaucoup plus présent que l'autre et ainsi favoriser l'une des voies de signalisation.

Nous ne pouvons pas non plus écarter l'hypothèse que les antagonistes utilisés puissent avoir une action à un autre niveau, bien que cela paraisse peu probable, les autres équipes ne relatant pas une telle possibilité.

Enfin, une autre hypothèse est que la régulation de l'activité serait bien plus complexe et impliquerait les cellules gliales et un ou des intermédiaires. En effet, l'ET-1 ne traverse pas la BHE, à priori, pour des concentrations plus faibles que celles ici employées (Johnstrom et al., 2005). Peut être avec des doses telles que 10 nM ou 100 nM d'ET-1, une petite portion du peptide traverse la BHE, ces concentrations, mêmes faibles, suffisant à agir sur les cellules gliales qui alors induisent une modification de l'activité de la Pgp des cellules endothéliales.

V-B. 2- Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature

Des expériences similaires ont été réalisées récemment chez le rat par Bauer *et al.* (2007). Cette équipe montre que l'ET-1 (10 et 100 nM) induit une diminution de l'activité de la Pgp des capillaires cérébraux pour de courts temps d'exposition (une à trois heures), et une augmentation de l'activité de la Pgp à des temps plus longs d'exposition (six heures). Nous observons, dans le modèle humain de BHE, une diminution de l'activité de la Pgp après 24 heures d'exposition. Serait-il possible que nous observions une augmentation de l'activité de la Pgp à des temps beaucoup plus longs d'exposition ? Il faut cependant garder à l'esprit qu'il existe de grandes différences entre les deux modèles utilisés. Tout d'abord, l'équipe de Bauer travaille sur une espèce différente, le rat, et sur des capillaires entiers qui ne sont pas mis en culture mais utilisés en l'état. D'autre part, le substrat de la Pgp utilisé par cette équipe est un dérivé de la cyclosporine A. Ces différences de procédés peuvent donc en partie expliquer les différences de résultats. Nous ne pouvons cependant pas écarter l'hypothèse que les cellules humaines se comportent différemment des cellules de rat. Rappelons d'ailleurs que chez le rat, deux gènes codent pour la Pgp tandis qu'un seul intervient chez l'homme (Loscher et Potschka, 2005b). Ceci pourrait également expliquer pourquoi l'ET-1 induit une modification de l'expression de la Pgp dans les capillaires de rat, ce que nous n'observons pas avec les cellules humaines.

Une autre différence à souligner entre le rat et l'homme est le fait que dans le modèle *in vitro* humain de BHE, l'effet le plus important et le plus significatif de l'ET-1 sur l'activité de la Pgp soit à une concentration de 10 nM et non de 100 nM. Bien sûr, nos résultats ont été obtenus à partir de cellules de seulement trois patients différents. Mais l'ET-1 est connu pour avoir différents effets à des concentrations différentes (Shirakami et al., 1993). Ainsi, peut-être qu'à de très hautes concentrations d'ET-1 les effets sur la Pgp sont moindres, ou peut-être impliquent-ils une autre voie de régulation. Dans la littérature il est décrit des différences d'effet d'ET-1 en fonction de sa concentration. Ainsi, de faibles concentrations d'ET-1 (10^{-9} M), sur des lignées de cellules intestinales chez le rat, induisent la prolifération cellulaire des cellules épithéliales, tandis

que de fortes concentrations d'ET-1 (10^{-7} M) engendraient une inhibition de la croissance cellulaire. Ceci souligne la dualité de l'axe de signalisation de l'ET-1 (Shigematsu et al., 1998).

Une autre hypothèse serait aussi qu'à une concentration de 10 nM, la voie de signalisation empruntée par l'ET-1 soit plus rapide qu'à 100 nM. Pour discriminer ces hypothèses, il faudrait réaliser des cinétiques à différentes concentrations et observer l'effet de l'ET-1 sur l'activité de la Pgp.

D'autre part, les résultats de Bauer et al. (2007) proviennent de l'étude de capillaires de rat qui ne sont pas mis en culture, contrairement à nos cellules. Ils se trouvent que des travaux publiés montrent que des organes en culture voient leurs concentrations en récepteurs ET_A et ET_B modifiées (une augmentation en protéines pour les deux récepteurs étant due à une augmentation de la transcription du gène pour ET_B, et une probable augmentation de la traduction dans le cas de ET_A) (Nilsson et al., 2008). Ainsi, dans notre modèle, peut-être les niveaux d'expression d'ET_A et ET_B diffèrent-ils de ceux *in vivo*.

Certains de nos résultats préliminaires semblent suggérer que l'effet de l'ET-1 sur la Pgp se ferait principalement via le récepteur ET_B, et partiellement via ET_A. Chez le rat, la diminution de l'activité de la Pgp se fait également via ET_B, tandis que l'augmentation de l'activité de la Pgp lors d'expositions plus longues à l'ET-1 impliquerait ET_A et ET_B. Dans la mesure où chez le rat, les voies de signalisation de ces récepteurs font appel à NOS et PKC, peut-être en est-il de même dans les cellules cérébrales humaines.

Un autre point intéressant est que nous n'assistons pas, dans nos conditions (BHE *in vitro* humaines adultes exposées 24 heures à 10 et 100 nM d'ET-1), à une rupture de la barrière. Bauer et al. (2007) n'ont pas non plus observé de modification de la perméabilité des capillaires cérébraux de rat après 6 heures d'incubation avec 100 nM d'ET-1. Cependant, notre équipe avait montré une augmentation de la perméabilité de la BHE dans un modèle *in vitro* humain de co-culture de cellules endothéliales cérébrales avec des astrocytes, le modèle étant exposé 24 heures à 200 nM d'ET-1 (Didier et al., 2003). Cette différence pourrait être imputée au fait que le modèle de Bauer, ou celui avec une co-culture en présence de cellules gliales, soit plus complet, et que les astrocytes seuls n'induisent pas toutes les propriétés de la BHE, puisque l'ajout de péricytes a été prouvé comme améliorant l'imperméabilité de la BHE *in vitro* (Nakagawa et al., 2007).

V-B. 3- Implication des différences d'activités dans les modèles adulte et foetal

L'activité de la Pgp a une influence sur le passage de certaines molécules thérapeutiques dans le SNC, ce transporteur étant très présent au niveau de la BHE. Plus la Pgp est active, moins certains médicaments pénétreront dans le SNC. Ce transporteur est donc en lui-même une cible thérapeutique. Ainsi, si les BHE fœtales et adultes ont bien des propriétés différentes, cela sous-entend qu'elles ne répondront pas de la même façon *in vivo* à l'ET-1.

V-C. Effet de l'ET-1 sur MCP-1

Nous avons observé que l'ET-1 induit une sécrétion significative de MCP-1 en basal, probablement majoritairement via ET_A, ce qui va dans le sens des résultats publiés par Chen *et al.* (2001). Nos résultats montrent également une tendance statistique à la sécrétion de MCP-1 en apical.

Notre modèle étant une co-culture de cellules endothéliales et de cellules gliales, nous pouvons nous demander quel type cellulaire sécrète le MCP-1 en basal et en apical, sachant que la sécrétion ne se fait pas forcément par les mêmes cellules en apical et en basal. En effet, les cellules endothéliales (Chen *et al.*, 2001) comme les cellules gliales (Huang *et al.*, 2002), et certains de nos résultats le montrent, peuvent sécréter MCP-1. Il semblerait cependant que les astrocytes soient la source majeure de MCP-1 dans le SNC (Huang *et al.*, 2002).

V-C. 1- Sécrétion de MCP-1 en basal

Les cellules gliales seraient ainsi la source majeure de MCP-1 dans le SNC (Huang *et al.*, 2002). Les études de Chen *et al.* (2001) montrent que des concentrations d'ET-1 comparables aux nôtres, mises en présence de CEMCH, induisent des sécrétions de MCP-1 d'environ 3 ng/mL pour 10⁶ cellules (si l'on se fie aux unités de la légende plutôt qu'à celles de la figure). Si nous essayons de rendre nos résultats comparables (bien que cela soit difficile puisqu'il y a dans notre modèle deux types cellulaires en présence), à savoir, si l'on rapporte la quantité de MCP-1 sécrété en basal au nombre total de cellules (endothéliales et gliales), nous sommes à un niveau d'environ 50 ng/mL pour 10⁶ cellules. Ainsi, il est probable qu'une grande proportion de MCP-1 en basal soit sécrétée par les cellules gliales.

Dans la mesure où il semble qu'ET-1 ne puisse pas traverser la BHE, en tout cas *in vivo* (Johnstrom *et al.*, 2005), cette sécrétion par les cellules gliales fait probablement intervenir un intermédiaire.

Nous ne pouvons pas écarter une autre hypothèse, afin de comprendre la différence entre nos résultats et ceux de Chen *et al.*, qui se base sur le fait que dans une co-culture, les CEMCH voient leurs propriétés modifier, puisque les CEMC et les CG agissent l'une sur l'autre (Abbott *et al.*, 2006; Persidsky *et al.*, 2006). Cela les rendrait peut-être capables ainsi de sécréter davantage de MCP-1, ou bien de posséder un arrangement des récepteurs ET_A et ET_B différent de celui trouvé dans les cellules considérées isolément, ce qui leur permettrait de répondre différemment à la stimulation par l'ET-1.

Quoiqu'il en soit, l'ET-1 induit une sécrétion de MCP-1 dans un modèle autologue humain adulte de BHE *in vitro*.

V-C. 2- Sécrétion de MCP-1 en apical

Nos résultats montrent, de façon moins significative, que l'ET-1 induirait une sécrétion de MCP-1 en apical, et ce, via le récepteur ET_B, une régulation négative de cette voie se faisant peut-être par le récepteur ET_A.

Les cellules endothéliales cérébrales sont capables de sécréter du MCP-1 (Chen et al., 2001). Nous pouvons cependant nous demander si le MCP-1 trouvé en apical ne proviendrait pas de celui sécrété en basal et d'un passage de la molécule depuis le compartiment basal vers le compartiment apical. Le passage para-cellulaire de MCP-1 à travers la BHE est très faible (Dzenko et al., 2001), et les BHE *in vitro* utilisées dans nos expériences avaient été soumises à un test sucrose, montrant une bonne étanchéité de la barrière (flux du sucrose inférieur à $0.2 \pm \text{SEM } 0,013 \mu\text{L}/\text{min}$, soit $3.3 \times 10^{-6} \pm \text{SEM } 0,022 \times 10^{-6} \text{ cm}/\text{sec}$). Ainsi MCP-1 ne semble pas pouvoir diffuser à travers la BHE. En revanche, une équipe a récemment montré que le MCP-1 pouvait être transporté depuis le côté basal vers le côté apical par transcytose (Ge et al., 2008). Cependant, ceci paraît peu envisageable, en tout cas pour de telles quantités de MCP-1. De plus, nos résultats montrent que l'augmentation de MCP-1 en apical proviendrait de l'action d'ET-1 sur le récepteur ET_B, alors que la sécrétion en basal serait due à l'action d'ET-1 sur le récepteur ET_A. Si le MCP-1 en apical provenait de la sécrétion en basal, la même voie de signalisation devrait logiquement être impliquée, à moins que l'ET-1 ne régule également le récepteur CCR2 impliqué dans la transcytose de MCP-1 (Ge et al., 2008), et ce, via ET_B (figure 51).

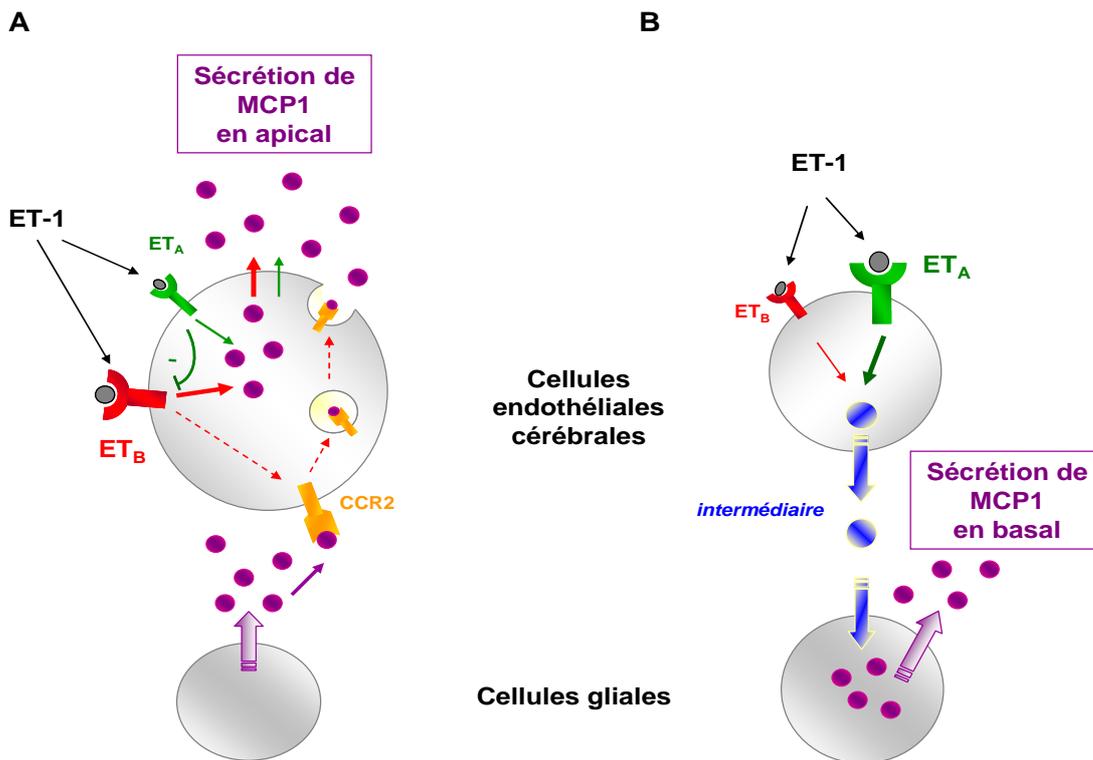


Figure 51 : Schématisation de certaines hypothèses concernant le mode d'action de l'ET-1 sur les cellules adultes humaines d'un modèle *in vitro* de BHE lors de l'induction de la sécrétion de MCP-1. **A**- L'ET-1 agirait via son récepteur ET_B sur les CEMCH adultes pour induire une sécrétion de MCP-1 dans le compartiment apical, l'action sur ET_A semblant réguler négativement l'effet via ET_B, et ET_B pourrait réguler positivement la transcytose de MCP-1 depuis le compartiment basal vers le compartiment apical via le récepteur CCR2 ; **B**- L'ET-1 agirait via son récepteur ET_A sur les cellules endothéliales et un médiateur agirait ensuite sur les CGH adultes pour induire la sécrétion de MCP-1 dans le compartiment basal.

Une action autocrine et paracrine de l'ET-1 a d'ailleurs déjà été décrite dans la littérature (Didier et al., 2003; Schinelli, 2006; Shichiri et al., 1991).

V-C. 3- Autres considérations

Nos résultats ne montrent qu'une tendance à l'augmentation de MCP-1 en basal pour 10 nM d'ET-1 alors que Chen *et al.* (2001) voient un effet significatif pour cette dose. Nous n'observons une significativité que pour 100 nM d'ET-1. Cette différence pourrait être imputée à la présence des cellules gliales dans notre modèle, les astrocytes ayant été montrés comme pouvant éliminer l'ET-1 extracellulaire (Hasselblatt et al., 1998). Ainsi ils feraient diminuer la concentration extracellulaire en ET-1, nous obligeant à appliquer de plus fortes concentrations d'ET-1 pour observer les effets. Ceci impliquerait qu'ET-1 puisse traverser la BHE, ce qui n'est pas le cas *in vivo*, mais rappelons qu'il s'agit alors de concentrations bien plus faibles. Aussi ne faut-il pas écarter la possibilité qu'à de fortes concentrations d'ET-1, une portion du peptide puisse traverser la BHE.

Notre équipe avait montré que l'ET-1 pouvait augmenter la perméabilité des BHE humaines fœtales *in vitro* exposées à 40 et 200 nM d'ET-1 durant 24 heures, et ce, uniquement lorsque les CEMC étaient en présence d'astrocytes (Didier et al., 2003). Un médiateur intermédiaire avait alors été proposé : IL-1 β , qui serait sécrété par les astrocytes. Au vu des nouveaux résultats ici exposés, nous pourrions nous demander si MCP-1 ne participerait pas à l'augmentation de la perméabilité de la BHE induite par l'ET-1, d'autant que MCP-1 est connu pour altérer la perméabilité de la BHE *in vivo* et *in vitro* chez l'animal (Stamatovic et al., 2005). En effet, une augmentation de la perméabilité de la BHE de souris a été observée *in vitro*, sur un modèle de co-culture astrocytes-cellules endothéliales cérébrales microvasculaires, lors d'une exposition à 100 nM de MCP-1. Les mêmes auteurs observaient également un effet de MCP-1, *in vivo*, sur la perméabilité de la BHE. Il semble, d'après les auteurs, que cette action de MCP-1 se fasse via son récepteur CCR2, conduisant à une altération des jonctions serrées (Stamatovic et al., 2005).

Des expériences sont donc prévues afin de vérifier cette hypothèse. Des BHE humaines adultes seront produites *in vitro*, et nous y ajouterons en basal (compartiment où nous avons trouvé les plus fortes concentrations de MCP-1 induites par ET-1) du MCP-1 à différentes concentrations. Nous garderons à l'esprit pour le choix des concentrations que, *in vitro*, l'activité chimiotactique de MCP-1 sur les monocytes et les lymphocytes fonctionne dès 0.1 nM (van et al., 1992; Yoshimura et al., 1989a), et que cette extravasation nécessite une augmentation de la perméabilité de la BHE.

Un test de perméabilité des BHE au sucrose radio-marqué sera alors effectué. Dans la mesure où nous avons vu plus haut que l'ET-1 n'induit pas nécessairement une rupture de la barrière dans une co-culture de cellules endothéliales et gliales, nous effectuerons également ces expériences avec des modèles de BHE comprenant la co-culture des cellules endothéliales avec des astrocytes.

V-D. Effet d'ET-1 sur les autres cytokines

V-D. 1- Effet sur la sécrétion d'IL-8

Nos études montrent que l'ET-1 induit la sécrétion d'IL-8 dans le compartiment basal de BHE humaines adultes. Les cellules endothéliales cérébrales humaines (Hofman et al., 1998) et les cellules gliales humaines (Aloisi et al., 1992) sont capables de sécréter IL-8. En basal, dans notre modèle, l'IL-8 pourrait donc être sécrétée par l'un ou l'autre de ces types cellulaires. Des résultats trouvés sur des cellules endothéliales cérébrales humaines isolées ont montré que la production d'IL-8, lors d'une exposition à l'ET-1 de ces cellules, impliquait le récepteur ET_A et les voies PKC et PTK (protein tyrosine kinase) (Zidovetzki et al., 1999). Nous pourrions imaginer que dans notre modèle ce soit également ces voies d'impliquées, d'autant plus nous avons montré la sollicitation du récepteur ET_A dans la sécrétion de MCP-1 par les mêmes cellules et dans les mêmes conditions, MCP-1 et IL-8 étant tous les deux des chimio-attractants.

Dans la mesure où la plus forte modulation de MCP-1 est observée pour 100 nM d'ET-1, alors que concernant l'IL-8 elle se produit pour 10 nM d'ET-1, nous pourrions nous demander si différentes concentrations d'ET-1 n'induiraient pas la sécrétion de différents types de chimiokines.

Ainsi, ces résultats renforcent le rôle de l'ET-1 dans le recrutement leucocytaire par le biais de la sécrétion d'IL-8 et de MCP-1.

V-D. 2- Effet sur la sécrétion d'IL-6

L'ET-1 induit également, presque significativement, la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-6. Les cellules endothéliales humaines du cordon ombilical stimulées par l'ET-1 ont été montrées comme capables de sécréter l'IL-6, cet effet semblant médié par ET_B (Stankova et al., 1996). Les cellules microgliales sont aussi capables de libérer de l'IL-6 après une exposition à des endothélines (Speciale et al., 1998). Les astrocytes, dans d'autres conditions de stimulation, peuvent sécréter l'IL-6 (Jack et al., 2005). Dans notre modèle de BHE, les CEMCH et les CGH sont dès lors toutes les deux susceptibles de sécréter l'IL-6.

Des expériences complémentaires doivent donc être réalisées afin d'étayer nos connaissances quant aux mécanismes d'action de l'ET-1 dans la sécrétion de ces cytokines.

D'autre part, l'IL-6 semble jouer un rôle dans la régulation de la Pgp, notamment dans l'expression de son gène au sein de cellules cancéreuses humaines (Conze et al., 2001), et dans l'expression de sa protéine au sein d'astrocytes de rat (Ronaldson et Bendayan, 2006). Se pourrait-il que l'IL-6 soit l'un des intermédiaires diminuant l'activité de la Pgp dans notre modèle exposé à l'ET-1 ?

VI- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En résumé, nos travaux montrent que le modèle *in vitro* de BHE humaines adultes exprime la Pgp. L'ET-1 ne module pas l'expression de ce transporteur mais diminue son activité probablement via le récepteur ET_B (figure 52). L'effet de l'ET-1 sur la Pgp a une réalité biologique puisque, par exemple, certains médicaments contre le VIH augmentent la sécrétion d'ET-1 par les cellules endothéliales (Hebert et al., 2004; Jiang et al., 2006).

D'autre part, l'ET-1 induit une sécrétion de MCP-1 et d'IL-8, deux molécules chimioattractantes impliquées dans le recrutement leucocytaire, et ce probablement via ses récepteurs ET_A et ET_B concernant MCP-1 (figure 52). Ces résultats viennent ainsi renforcer ceux existant et attestant du rôle primordial de l'ET-1 dans la neuro-inflammation.

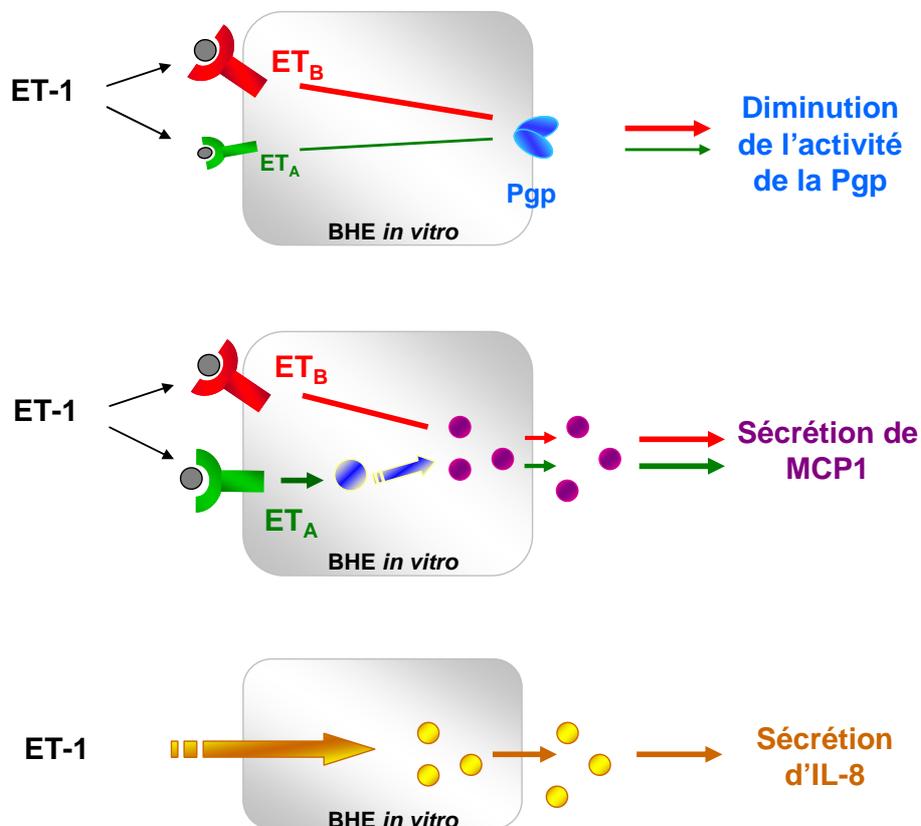


Figure 52 : L'ET-1, dans un modèle *in vitro* humain adulte de BHE, induit une diminution de l'activité de la Pgp principalement via ET_B, induit une sécrétion de MCP1 via ET_A et ET_B (probablement avec un intermédiaire via ET_A) et induit une sécrétion d'IL-8.

Si certains de nos résultats méritent d'être confirmés sur plusieurs patients, ils suggèrent cependant quelques interrogations notamment sur les mécanismes et voies de signalisation impliqués dans les modulations observées. Ainsi, il serait intéressant de connaître les voies impliquées dans la régulation de la Pgp et dans la sécrétion de MCP-1 et IL-8.

Les différences entre le modèle adulte et le modèle fœtal de BHE suscitent également nombre de questions. Nous envisageons de regarder si les BHE fœtales et adultes possèdent une expression différente des récepteurs ET_A et ET_B. Il serait également intéressant d'observer s'il y aurait des différences dans les cascades de signalisation impliquées dans la régulation de la Pgp entre ces deux modèles.

D'autre part, de prochaines expériences permettront de savoir si l'ET-1 traverse ou non notre modèle *in vitro* de BHE. En regardant en parallèle quel type cellulaire sécrète le MCP-1, nous pourrions alors envisager ou non de rechercher l'intermédiaire sécrété par les cellules endothéliales, dans le cas où ce serait effectivement les cellules gliales qui sécrèteraient la chimiokine.

L'ET-1 induit la sécrétion de MCP-1 au niveau de la BHE. Dès lors, nous nous pouvons nous interroger quant aux effets de MCP-1 sur la BHE, notamment sa perméabilité et l'activité de ses transporteurs ABC.

Nous souhaiterions également étudier les mécanismes de régulation de la neuro-inflammation par l'ET-1 dans le modèle fœtal, dans un contexte de maladies cérébrales inflammatoires pédiatriques.

Nous envisageons aussi d'étudier l'effet d'ET-1 sur d'autres transporteurs ABC tels que les MRP1, MRP2, MRP4 et MRP5 qui sont présentes au niveau de la BHE humaine.

Nous pouvons légitimement nous demander si, au regard de nos résultats, l'ET-1 ou une molécule de son axe de signalisation pourrait être une cible pharmacologique. En effet, la neuro-inflammation est associée à de nombreuses pathologies cérébrales. Dans la mesure où l'ET-1 est un acteur de cette neuro-inflammation, diminuer sa sécrétion pourrait sans doute avoir des effets bénéfiques. Il ne faut cependant pas oublier que l'ET-1 a de nombreux rôles biologiques, aussi, une telle stratégie semblerait plus vraisemblable à un niveau local.

D'autre part, l'ET-1 module l'activité de la Pgp. Or la Pgp prend en charge un grand nombre de molécules thérapeutiques, les empêchant d'entrer dans le SNC, comme c'est le cas pour des médicaments prescrits dans la maladie de Parkinson (Uhr et al., 2005), contre le SIDA (Polli et al., 1999), dans la sclérose amyotrophique latérale (Milane et al., 2007), ou encore dans la maladie d'Alzheimer (Saengkhæ et al., 2007). Cependant, diminuer l'activité de la Pgp peut avoir des conséquences puisque la Pgp est une défense naturelle du SNC contre des composés toxiques comme les peptides β amyloïdes dont la Pgp empêche l'accumulation dans le cerveau (Cirrito et al., 2005).

De plus, si la Pgp était inactivée, les autres transporteurs ABC de la BHE ne pourraient-ils pas contrebalancer cette perte en prenant davantage en charge certaines molécules ?

Ainsi, l'ET-1 et les molécules associées à son axe de signalisation jouent un rôle sur différents aspects de la neuro-inflammation et de la régulation des transporteurs ABC. Des études complémentaires afin de déterminer toutes les voies et molécules modulées par l'ET-1 permettront d'améliorer nos connaissances sur les pathologies cérébrales liées à la neuro-inflammation.

PUBLICATIONS ET POSTERS

ARTICLE ACCEPTE ET PUBLIE

A. Hembury, A. Mabondzo. Endothelin-1 Reduces P-Glycoprotein Transport Activity in an In Vitro Model of Human Adult Blood-brain Barrier. *Cellular and molecular neurobiology* (2008). PUBLIE LE 01/04/2008

ARTICLE EN SOUMISSION dans *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*

A. Hembury, A. Mabondzo. In an in vitro model of autologous human adult blood-brain barrier, endothelin-1 increases monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin 8 secretion.

ARTICLE ACCEPTE, non présenté dans ce travail de thèse

L. Bousquet, C. Roucairol, **A. Hembury**, M.-C. Nevers, C. Creminon, R. Farinotti, A. Mabondzo. Comparison of ABC transporter modulation by atazanavir in lymphocytes and human brain endothelial cells: ABC transporters are involved in the atazanavir-limited passage across an in vitro human model of the blood-brain barrier. *AIDS Research and Human Retroviruses* (2008).

POSTERS

EURO-CNS 2008, 9th European Congress of Neuropathology, 8 au 10 mai 2008 à Athènes. **A. Hembury**, A. Mabondzo, Endothelin-1 Reduces P-Glycoprotein Transport Activity in an In Vitro Model of Human Adult Blood-brain Barrier. *Clinical Neuropathology* (2008) May/June 27(3):166.



H 01

ENDOTHELIN 1 REDUCES P-GLYCOPROTEIN TRANSPORT ACTIVITY IN A HUMAN ADULT IN VITRO BLOOD BRAIN BARRIER MODEL.

A. Hembury¹, J-R. Deverre², M. Bottlaender², A. Mabondzo¹
 1- CEA Saclay, Gif sur Yvette, France 2- CEA Orsay, Orsay, France



CONTEXT

In the central nervous system (CNS) there are various barriers that isolate neurons from blood or cerebrospinal fluid to maintain an optimal chemical environment. The blood-brain barrier (BBB) is composed of several layers, starting on the blood side with capillary endothelial cells, then a basement membrane, pericytes and astrocytes. BBB is a key element in neuroinflammation that is associated with many brain diseases. (Ballabh *et al.*, 2004)

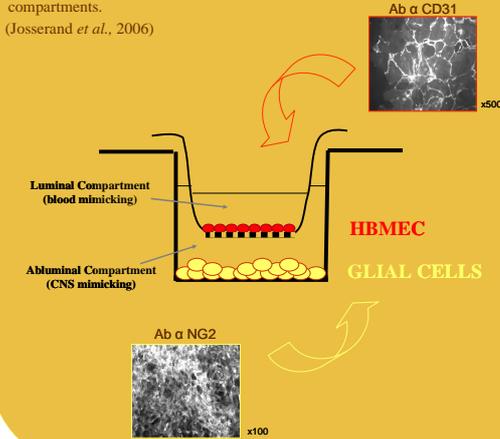
Specialised transporters at the BBB govern some of the molecular efflux and therefore participate to the regulation of xenobiotics passage into the CNS. One of the best studied transporters is P-glycoprotein (Pgp) as it has an affinity for a large number of therapeutic drugs. Pgp is an ATP Binding Cassette (ABC) transporter localised on the apical side of capillary endothelial brain. (Loscher and Potschka, 2005)

Endothelin 1 (ET-1), an *in vivo* and *in vitro* artery vasoconstrictive and vasodilator peptide, has various biological roles. It is released in several CNS disorders. Members of the endothelin family are released by various cell types in brain, including endothelial cells and some glial cells, and in a context of inflammation (Schinelli, 2006; Didier *et al.*, 2003). ET-1 regulates Pgp transport activity in rat brain capillaries (Bauer *et al.*, 2007).

Although there are data from animal models, human models have been studied much less. Therefore, we studied Pgp transport activity in a human *in vitro* model of BBB exposed to ET-1.

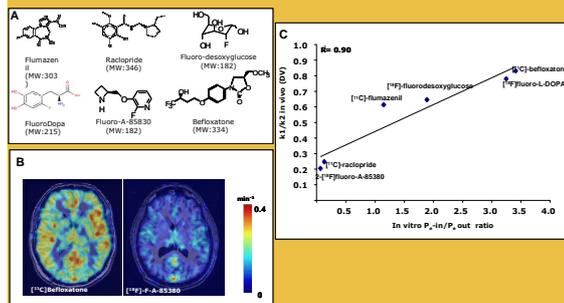
In vitro BBB MODEL

Adult human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) were cocultured with human adult glial cells from the same individual on a Transwells® to mimic blood and CNS compartments. (Josserand *et al.*, 2006)



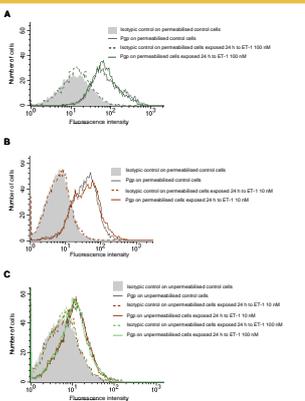
Predictive power of the BBB MODEL

The predictive power of this *in vitro* model was assessed by the comparison with the *in vivo* human BBB permeability studied by Positron Emission Tomography using six radio-labelled compounds. The *in vitro* BBB model allows to evaluate the *in vivo* BBB permeability to a specific molecule, and its transportation by Pgp.



Comparison of *in vitro* and *in vivo* molecule passage through the human BBB. The passage through BBB of six compounds with different size ranges and hydrophobic properties were tested. *In vivo*, PET imaging was used while *in vitro*, clearances were calculated. A- Structures of these 6 clinical radioligands B- PET imaging C- *In vitro*/*in vivo* drug transport correlation

ET-1 has no effect on Pgp expression

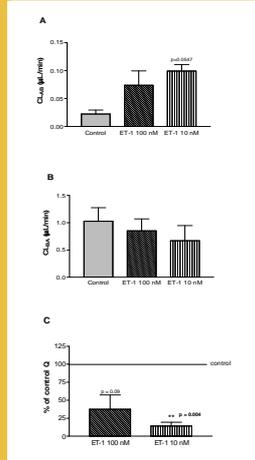


There is no modulation of total nor membrane bound Pgp expression.

ET-1 Reduces Pgp Activity

In vitro human adult BBB exposed during 24 hours to ET-1 either 10 nM or 100 nM.

The passage through BBB of six compounds with different size ranges and hydrophobic properties were tested. *In vivo*, PET imaging was used while *in vitro*, clearances were calculated. A- Structures of these 6 clinical radioligands B- PET imaging C- *In vitro*/*in vivo* drug transport correlation



Pgp transport activity is decreased when *in vitro* BBBs are exposed to ET-1. The clearances of Pgp specific substrat, digoxin, are modulated : they are increased from blood to CNS mimicking compartments, while they are diminished from CNS to blood, as Pgp has a lower capacity to efflux digoxin towards the apical chamber.

CONCLUSION

In vitro, no modulation of Pgp expression was observed after the exposure to ET-1, nor on endothelial cells, neither on glial cells. However, our findings show that ET-1, after 24 hours, reduces Pgp activity at a concentration of 10 nM, when a higher concentration (100 nM) hasn't such a strong and significant effect. Those are the first data to demonstrate a down regulation of Pgp transport by ET-1, a molecule involved in inflammation, in a human BBB model.

REFERENCES

Ballabh P, Braun A, Ndergaard M. (2004) The blood-brain barrier: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 16(1):1-13
 Loscher W, Potschka H (2005) Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci.* 6:591-602
 Schinelli S. (2006) Pharmacology and physiology of the brain endothelin system: an overview. *Curr Med Chem.* 13(6):627-638
 Didier N, Romero JA, Creminon C, Wikjousien A, Grassi J, Mabondzo A (2003) Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1-induced tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem.* 86:246-254
 Bauer B, Hartz AM, Miller DS. (2007) Tumour necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity in the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol.* 71:667-675
 Josserand V, Pletier H, de Bruijn B, Kopp B, Kubisa B, Hinson F, Decrooge F, Bissigier R, Bevoen F, Chassoux F, Dumas Dupont C, Egan E, Delle F, Mabondzo A, Tavitian B (2006) Evolution of drug penetration into the brain: a double study by *in vivo* imaging with positron emission tomography and using an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 316:79-86

BIBLIOGRAPHIE

Références non incluses par le logiciel Reference Manager :

Biedl A. et Kraus R. Über einer bisher unbekannte toxische Wirkung der Gallensauren auf das Zentralnervensystem. Zentralblatt Innere Medizin (1898), 19, 1185-1200.

Ehrlich, P. Das Sauerstoffbeduerfnis des Organismus: Eine Farbenanalytische Studie. Hirschwald, Berlin (1885), Vol. 8., p. 167.

Goldmann, E. E. (1909). Die aussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der 'vitalen Farbung'. Beitrage Klinischen Chirurgie 64, 192-265.

Goldmann, E. E. (1913). Vitalfarbung am Zentralnervensystem. Abhandlungen Preussischen Akademie der Wissenschaften Physikalisch Mathematisch klasse I, 1-60.

Lewandowsky M. Zur Lehre der Cerebrospinal flussigkeit. Zeitschriftfur Klinische Medizin (1900), 40, 480-494.

Stern L. et Gaultier R. (1921). Rapport entre le liquide céphalo-rachidien et la circulation sanguine. Arch. Int. Physiol., 17:138-192

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott N. J. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem.Int.* 2004, 45: 545-552.
- Abbott N. J., Ronnback L., et Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev.Neurosci.* 2006, 7: 41-53.
- Abd-El-Basset E. M. et Fedoroff S. Immunolocalization of the alpha isoform of smooth muscle actin in mouse astroglia in cultures. *Neurosci.Lett.* 1991, 125: 117-120.
- Alavijeh M. S., Chishty M., Qaiser M. Z., et Palmer A. M. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx.* 2005, 2: 554-571.
- Allavena P., Bianchi G., Zhou D., van Damme J., Jilek P., Sozzani S., et Mantovani A. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemoattractant protein-1, -2 and -3. *Eur J Immunol.* 1994, 24: 3233-3236.
- Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia* 2001, 36: 165-179.
- Aloisi F., Care A., Borsellino G., Gallo P., Rosa S., Bassani A., Cabibbo A., Testa U., Levi G., et Peschle C. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1992, 149: 2358-2366.
- Anderson E., Zink W., Xiong H., et Gendelman H. E. HIV-1-associated dementia: a metabolic encephalopathy perpetrated by virus-infected and immune-competent mononuclear phagocytes. *J Acquir.Immune.Defic.Syndr.* 2002, 31 Suppl 2: S43-S54.
- Andjelkovic A. V., Kerkovich D., et Pachter J. S. Monocyte:astrocyte interactions regulate MCP-1 expression in both cell types. *J Leukoc.Biol.* 2000, 68: 545-552.
- Arai H., Hori S., Aramori I., Ohkubo H., et Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990, 348: 730-732.
- Armulik A., Abramsson A., et Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ.Res.* 2005, 97: 512-523.
- Ayalon O., Sabanai H., Lampugnani M. G., Dejana E., et Geiger B. Spatial and temporal relationships between cadherins and PECAM-1 in cell-cell junctions of human endothelial cells. *J Cell Biol.* 1994, 126: 247-258.
- Bagnato A., Rosano L., Spinella F., Di Castro, V., Tecce R., et Natali P. G. Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res.* 2004, 64: 1436-1443.
- Ballabh P., Braun A., et Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol.Dis.* 2004, 16: 1-13.
- Bandopadhyay R., Orte C., Lawrenson J. G., Reid A. R., De Silva S., et Allt G. Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J Neurocytol.* 2001, 30: 35-44.
- Banks W. A. Physiology and pathology of the blood-brain barrier: implications for microbial pathogenesis, drug delivery and neurodegenerative disorders. *J Neurovirol.* 1999, 5: 538-555.
- Banks W. A. et Kastin A. J. Relative contributions of peripheral and central sources to levels of IL-1 alpha in the cerebral cortex of mice: assessment with species-specific enzyme immunoassays. *J Neuroimmunol.* 1997, 79: 22-28.

- Banks W. A., Kastin A. J., et Broadwell R. D. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*. 1995, 2: 241-248.
- Bankstahl J. P., Hoffmann K., Bethmann K., et Loscher W. Glutamate is critically involved in seizure-induced overexpression of P-glycoprotein in the brain. *Neuropharmacology* 2008,
- Barger S. W., Horster D., Furukawa K., Goodman Y., Krieglstein J., et Mattson M. P. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92: 9328-9332.
- Barrand M. A., Robertson K. J., et von Weikersthal S. F. Comparisons of P-glycoprotein expression in isolated rat brain microvessels and in primary cultures of endothelial cells derived from microvasculature of rat brain, epididymal fat pad and from aorta. *FEBS Lett*. 1995, 374: 179-183.
- Bart J., Groen H. J., Hendrikse N. H., van der Graaf W. T., Vaalburg W., et de Vries E. G. The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treat.Rev*. 2000, 26: 449-462.
- Bauer B., Hartz A. M., Fricker G., et Miller D. S. Modulation of p-glycoprotein transport function at the blood-brain barrier. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2005, 230: 118-127.
- Bauer B., Hartz A. M., et Miller D. S. Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity at the blood-brain barrier. *Mol.Pharmacol*. 2007, 71: 667-675.
- Bazan J. F., Bacon K. B., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., Greaves D. R., Zlotnik A., et Schall T. J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997, 385: 640-644.
- Beattie E. C., Stellwagen D., Morishita W., Bresnahan J. C., Ha B. K., von Zastrow M., Beattie M. S., et Malenka R. C. Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science* 2002, 295: 2282-2285.
- Bendayan R., Ronaldson P. T., Gingras D., et Bendayan M. In situ localization of P-glycoprotein (ABCB1) in human and rat brain. *J Histochem.Cytochem*. 2006, 54: 1159-1167.
- Berezowski V., Landry C., Dehouck M. P., Cecchelli R., et Fenart L. Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res*. 2004, 1018: 1-9.
- Bezzi P. et Volterra A. A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr.Opin.Neurobiol*. 2001, 11: 387-394.
- Bickel U., Yoshikawa T., et Pardridge W. M. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv.Drug Deliv.Rev*. 2001, 46: 247-279.
- Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr.Opin.Cell Biol*. 1995, 7: 728-735.
- Blamire A. M., Anthony D. C., Rajagopalan B., Sibson N. R., Perry V. H., et Styles P. Interleukin-1beta - induced changes in blood-brain barrier permeability, apparent diffusion coefficient, and cerebral blood volume in the rat brain: a magnetic resonance study. *J Neurosci*. 2000, 20: 8153-8159.
- Blomstrand F., Venance L., Siren A. L., Ezan P., Hanse E., Glowinski J., Ehrenreich H., et Giaume C. Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. *Eur.J.Neurosci*. 2004, 19: 1005-1015.
- Blum-Degen D., Muller T., Kuhn W., Gerlach M., Przuntek H., et Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci.Lett*. 1995, 202: 17-20.
- Bohm M., Moellmann G., Cheng E., varez-Franco M., Wagner S., Sassone-Corsi P., et Halaban R. Identification of p90RSK as the probable CREB-Ser133 kinase in human melanocytes. *Cell Growth Differ*. 1995, 6: 291-302.

- Bonifati D. M. et Kishore U. Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol Immunol.* 2007, 44: 999-1010.
- Borish L. C. et Steinke J. W. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin.Immunol.* 2003, 111: S460-S475.
- Borst P., Zelcer N., et van Helvoort A. ABC transporters in lipid transport. *Biochim.Biophys.Acta* 2000, 1486: 128-144.
- Brabers N. A. et Nottet H. S. Role of the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta in HIV-associated dementia. *Eur J Clin.Invest* 2006, 36: 447-458.
- Brack-Werner R. Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis. *AIDS* 1999, 13: 1-22.
- Bradley M. N., Zhou L., et Smale S. T. C/EBPbeta regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Mol Cell Biol.* 2003, 23: 4841-4858.
- Brat D. J., Bellail A. C., et Van Meir E. G. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro.Oncol.* 2005, 7: 122-133.
- Brenneman D. E., Schultzberg M., Bartfai T., et Gozes I. Cytokine regulation of neuronal survival. *J Neurochem.* 1992, 58: 454-460.
- Browatzki M., Schmidt J., Kubler W., et Kranzhofer R. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res. Cardiol.* 2000, 95: 98-105.
- Brown A. M. et Ransom B. R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 2007, 55: 1263-1271.
- Brown P. C. et Silverman J. A. Characterization of the rat mdr2 promoter and its regulation by the transcription factor Sp1. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24: 3235-3241.
- Buckley C. D., Doyonnas R., Newton J. P., Blystone S. D., Brown E. J., Watt S. M., et Simmons D. L. Identification of alpha v beta 3 as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1. *J Cell Sci* 1996, 109 (Pt 2): 437-445.
- Buniatian G. H. Further similarities between astrocytes and perisinusoidal stellate cells of liver (Ito cells): colocalization of desmin and glial fibrillary acidic protein in astroglial primary cultures. *Biol.Cell* 1997, 89: 169-177.
- Cantaro S., Milan Manani S., Marcon R., Bonfante L., Masiero M., D'Angelo A., et Calo L. Urinary excretion of vasoactive substances in chronic renal failure. *Clin.Nephrol.* 2001, 55: 393-399.
- Cao C. C., Ding X. Q., Ou Z. L., Liu C. F., Li P., Wang L., et Zhu C. F. In vivo transfection of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int.* 2004, 65: 834-845.
- Carr M. W., Roth S. J., Luther E., Rose S. S., et Springer T. A. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91: 3652-3656.
- Cavaillon J. M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol.(Noisy.-le-grand)* 2001, 47: 695-702.
- Cazaubon S., Chaverot N., Romero I. A., Girault J. A., Adamson P., Strosberg A. D., et Couraud P. O. Growth factor activity of endothelin-1 in primary astrocytes mediated by adhesion-dependent and -independent pathways. *J Neurosci.* 1997, 17: 6203-6212.
- Cecchelli R., Berezowski V., Lundquist S., Culot M., Renftel M., Dehouck M. P., et Fenart L. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev.Drug Discov.* 2007, 6: 650-661.

- Chan L. M., Lowes S., et Hirst B. H. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm.Sci* 2004, 21: 25-51.
- Chang X. B. A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Rev.* 2007, 26: 15-37.
- Chen P., Shibata M., Zidovetzki R., Fisher M., Zlokovic B. V., et Hofman F. M. Endothelin-1 and monocyte chemoattractant protein-1 modulation in ischemia and human brain-derived endothelial cell cultures. *J Neuroimmunol.* 2001, 116: 62-73.
- Chen X. L., Zhang Q., Zhao R., et Medford R. M. Superoxide, H₂O₂, and iron are required for TNF-alpha-induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol* 2004, 286: H1001-H1007.
- Cheng B., Christakos S., et Mattson M. P. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 1994, 12: 139-153.
- Cheng M., Li Y., Wu J., Nie Y., Li L., Liu X., Charoude H. N., et Chen H. IL-8 induces imbalances between nitric oxide and endothelin-1, and also between plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator in cultured endothelial cells. *Cytokine* 2008, 41: 9-15.
- Chin J. E., Soffir R., Noonan K. E., Choi K., et Roninson I. B. Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. *Mol Cell Biol.* 1989, 9: 3808-3820.
- Chin K. V., Ueda K., Pastan I., et Gottesman M. M. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 1992, 255: 459-462.
- Choi J. et Koh S. Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Med J* 2008, 49: 1-18.
- Cirrito J. R., Deane R., Fagan A. M., Spinner M. L., Parsadanian M., Finn M. B., Jiang H., Prior J. L., Sagare A., Bales K. R., Paul S. M., Zlokovic B. V., Piwnica-Worms D., et Holtzman D. M. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin.Invest* 2005, 115: 3285-3290.
- Clozel M., Loffler B. M., Breu V., Hilfiger L., Maire J. P., et Butscha B. Downregulation of endothelin receptors by autocrine production of endothelin-1. *Am J Physiol* 1993, 265: C188-C192.
- Cole S. P., Bhardwaj G., Gerlach J. H., Mackie J. E., Grant C. E., Almquist K. C., Stewart A. J., Kurz E. U., Duncan A. M., et Deeley R. G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992, 258: 1650-1654.
- Colgan O. C., Collins N. T., Ferguson G., Murphy R. P., Birney Y. A., Cahill P. A., et Cummins P. M. Influence of basolateral condition on the regulation of brain microvascular endothelial tight junction properties and barrier function. *Brain Res.* 2008, 1193: 84-92.
- Combates N. J., Rzepka R. W., Chen Y. N., et Cohen D. NF-IL6, a member of the C/EBP family of transcription factors, binds and trans-activates the human MDR1 gene promoter. *J Biol.Chem.* 1994, 269: 29715-29719.
- Conant K., Garzino-Demo A., Nath A., McArthur J. C., Halliday W., Power C., Gallo R. C., et Major E. O. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95: 3117-3121.
- Conze D., Weiss L., Regen P. S., Bhushan A., Weaver D., Johnson P., et Rincon M. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001, 61: 8851-8858.
- Cooray H. C., Blackmore C. G., Maskell L., et Barrand M. A. Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport* 2002, 13: 2059-2063.

- Cordon-Cardo C., O'Brien J. P., Casals D., Rittman-Grauer L., Biedler J. L., Melamed M. R., et Bertino J. R. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1989, 86: 695-698.
- Cornwell M. M. The human multidrug resistance gene: sequences upstream and downstream of the initiation site influence transcription. *Cell Growth Differ.* 1990, 1: 607-615.
- Cornwell M. M. et Smith D. E. SP1 activates the MDR1 promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity. *J Biol.Chem.* 1993, 268: 19505-19511.
- Crossgrove J. S., Smith E. L., et Zheng W. Macromolecules involved in production and metabolism of beta-amyloid at the brain barriers. *Brain Res.* 2007, 1138: 187-195.
- Dallas S., Miller D. S., et Bendayan R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol.Rev.* 2006, 58: 140-161.
- Dallas S., Zhu X., Baruchel S., Schlichter L., et Bendayan R. Functional expression of the multidrug resistance protein 1 in microglia. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 2003, 307: 282-290.
- Dallasta L. M., Pisarov L. A., Esplen J. E., Werley J. V., Moses A. V., Nelson J. A., et Achim C. L. Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol* 1999, 155: 1915-1927.
- Dar A., Goichberg P., Shinder V., Kalinkovich A., Kollet O., Netzer N., Margalit R., Zsak M., Nagler A., Hardan I., Resnick I., Rot A., et Lapidot T. Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat Immunol.* 2005, 6: 1038-1046.
- Daschner P. J., Ciolino H. P., Plouzek C. A., et Yeh G. C. Increased AP-1 activity in drug resistant human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res.Treat.* 1999, 53: 229-240.
- de Boer A. G. et Gaillard P. J. Drug targeting to the brain. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 2007, 47: 323-355.
- de Lange E. C. Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 2004, 56: 1793-1809.
- Dean M. et Allikmets R. Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg.Biomembr.* 2001, 33: 475-479.
- Deane R. et Zlokovic B. V. Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr.Alzheimer Res.* 2007, 4: 191-197.
- Decleves X., Regina A., Laplanche J. L., Roux F., Boval B., Launay J. M., et Scherrmann J. M. Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci.Res.* 2000, 60: 594-601.
- Deeken J. F. et Loscher W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin.Cancer Res.* 2007, 13: 1663-1674.
- Dehouck M. P., Meresse S., Delorme P., Fruchart J. C., et Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem.* 1990, 54: 1798-1801.
- Dehouck M. P., Vigne P., Torpier G., Breittmayer J. P., Cecchelli R., et Frelin C. Endothelin-1 as a mediator of endothelial cell-pericyte interactions in bovine brain capillaries. *J Cereb.Blood Flow Metab* 1997, 17: 464-469.
- Del Maschio A., De Luigi A., Martin-Padura I., Brockhaus M., Bartfai T., Fruscella P., Adorini L., Martino G., Furlan R., De Simoni M. G., et Dejana E. Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J Exp.Med* 1999, 190: 1351-1356.

- del Zoppo G. J. et Hallenbeck J. M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb.Res.* 2000, 98: 73-81.
- Didier N., Banks W. A., Creminon C., reudde-Bosquet N., et Mabondzo A. HIV-1-induced production of endothelin-1 in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Neuroreport* 2002, 13: 1179-1183.
- Didier N., Romero I. A., Creminon C., Wijkhuisen A., Grassi J., et Mabondzo A. Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J.Neurochem.* 2003, 86: 246-254.
- Dohgu S., Takata F., Yamauchi A., Nakagawa S., Egawa T., Naito M., Tsuruo T., Sawada Y., Niwa M., et Kataoka Y. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res.* 2005, 1038: 208-215.
- Dong F., Zhang X., Wold L. E., Ren Q., Zhang Z., et Ren J. Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br.J Pharmacol.* 2005, 145: 323-333.
- Dore-Duffy P., Katychev A., Wang X., et Van Buren E. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb.Blood Flow Metab* 2006, 26: 613-624.
- Dos Santos S. M., Weber C. C., Franke C., Muller W. E., et Eckert G. P. Cholesterol: Coupling between membrane microenvironment and ABC transporter activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2007, 354: 216-221.
- Doyle L. A., Yang W., Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. K., et Ross D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95: 15665-15670.
- Drach J., Gsur A., Hamilton G., Zhao S., Angerler J., Fiegl M., Zojer N., Raderer M., Haberl I., Andreeff M., et Huber H. Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes. *Blood* 1996, 88: 1747-1754.
- Dzenko K. A., Andjelkovic A. V., Kuziel W. A., et Pachter J. S. The chemokine receptor CCR2 mediates the binding and internalization of monocyte chemoattractant protein-1 along brain microvessels. *J Neurosci.* 2001, 21: 9214-9223.
- Dzwonek J., Rylski M., et Kaczmarek L. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett.* 2004, 567: 129-135.
- Eckman E. A., Watson M., Marlow L., Sambamurti K., et Eckman C. B. Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J Biol.Chem.* 2003, 278: 2081-2084.
- Egidy G., Eberl L. P., Valdenaire O., Irmeler M., Majdi R., Diserens A. C., Fontana A., Janzer R. C., Pinet F., et Juillerat-Jeanneret L. The endothelin system in human glioblastoma. *Lab Invest* 2000, 80: 1681-1689.
- Ehrenreich H., Anderson R. W., Fox C. H., Rieckmann P., Hoffman G. S., Travis W. D., Coligan J. E., Kehrl J. H., et Fauci A. S. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp.Med* 1990, 172: 1741-1748.
- Ehrenreich H., Anderson R. W., Ogino Y., Rieckmann P., Costa T., Wood G. P., Coligan J. E., Kehrl J. H., et Fauci A. S. Selective autoregulation of endothelins in primary astrocyte cultures: endothelin receptor-mediated potentiation of endothelin-1 secretion. *New Biol.* 1991, 3: 135-141.
- Eisenberg E., Erlich T., Zinder O., Lichinsky S., Diamond E., Pud D., et Davar G. Plasma endothelin-1 levels in patients with complex regional pain syndrome. *Eur J Pain* 2004, 8: 533-538.
- Elangbam C. S., Qualls C. W., Jr., et Dahlgren R. R. Cell adhesion molecules--update. *Vet.Pathol* 1997, 34: 61-73.

- Elesber A. A., Bonetti P. O., Woodrum J. E., Zhu X. Y., Lerman L. O., Younkin S. G., et Lerman A. Bosentan preserves endothelial function in mice overexpressing APP. *Neurobiol.Aging* 2006, 27: 446-450.
- Elhofy A., Wang J., Tani M., Fife B. T., Kennedy K. J., Bennett J., Huang D., Ransohoff R. M., et Karpus W. J. Transgenic expression of CCL2 in the central nervous system prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Leukoc.Biol.* 2005, 77: 229-237.
- Elmarakby A. A., Quigley J. E., Imig J. D., Pollock J. S., et Pollock D. M. TNF-alpha inhibition reduces renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 2008, 294: R76-R83.
- Eng L. F., Ghirnikar R. S., et Lee Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem.Res.* 2000, 25: 1439-1451.
- Engelhardt B. et Ransohoff R. M. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 2005, 26: 485-495.
- Englund G., Jacobson A., Rorsman F., Artursson P., Kindmark A., et Ronnblom A. Efflux transporters in ulcerative colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflamm.Bowel.Dis.* 2007, 13: 291-297.
- Ergul A., Portik-Dobos V., Giulumian A. D., Molero M. M., et Fuchs L. C. Stress upregulates arterial matrix metalloproteinase expression and activity via endothelin A receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol* 2003, 285: H2225-H2232.
- Evans C. A., Reynolds J. M., Reynolds M. L., Saunders N. R., et Segal M. B. The development of a blood-brain barrier mechanism in foetal sheep. *J Physiol* 1974, 238: 371-386.
- Fabbrini M. S., Vitale A., Pedrazzini E., Nitti G., Zamai M., Tamburin M., Caiolfa V. R., Patrono C., et Benatti L. In vivo expression of mutant preproendothelins: hierarchy of processing events but no strict requirement of Trp-Val at the processing site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90: 3923-3927.
- Fabry Z., Fitzsimmons K. M., Herlein J. A., Moninger T. O., Dobbs M. B., et Hart M. N. Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes. *J Neuroimmunol.* 1993, 47: 23-34.
- Farina C., Aloisi F., et Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 2007, 28: 138-145.
- Farkas E. et Luiten P. G. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog.Neurobiol.* 2001, 64: 575-611.
- Fellin T., D'Ascenzo M., et Haydon P. G. Astrocytes control neuronal excitability in the nucleus accumbens. *ScientificWorldJournal.* 2007, 7: 89-97.
- Fenstermacher J., Gross P., Sposito N., Acuff V., Pettersen S., et Gruber K. Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1988, 529: 21-30.
- Fernandez C., Buyse M., German-Fattal M., et Gimenez F. Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality. *J.Pharm.Pharm.Sci.* 2004, 7: 359-371.
- Fernandez-Patron C., Radomski M. W., et Davidge S. T. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ.Res.* 1999, 85: 906-911.
- Frei K., Malipiero U. V., Leist T. P., Zinkernagel R. M., Schwab M. E., et Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol.* 1989, 19: 689-694.
- Funke-Kaiser H., Lemmer J., Langsdorff C. V., Thomas A., Kovacevic S. D., Strasdat M., Behrouzi T., Zollmann F. S., Paul M., et Orzechowski H. D. Endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) is a downstream target of the homeobox transcription factor Nkx2-5. *FASEB J* 2003, 17: 1487-1489.

- Gadea A., Schinelli S., et Gallo V. Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J Neurosci.* 2008, 28: 2394-2408.
- Gadient R. A. et Otten U. H. Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog.Neurobiol.* 1997, 52: 379-390.
- Gallai V., Sarchielli P., Firenze C., Trequattrini A., Paciaroni M., Usai F., et Palumbo R. Endothelin 1 in migraine and tension-type headache. *Acta Neurol.Scand.* 1994, 89: 47-55.
- Gallelli L., Pelaia G., D'Agostino B., Cuda G., Vatrella A., Fratto D., Gioffre V., Galderisi U., De Nardo M., Mastruzzo C., Salinaro E. T., Maniscalco M., Sofia M., Crimi N., Rossi F., Caputi M., Costanzo F. S., Maselli R., Marsico S. A., et Vancheri C. Endothelin-1 induces proliferation of human lung fibroblasts and IL-11 secretion through an ET(A) receptor-dependent activation of MAP kinases. *J Cell Biochem.* 2005, 96: 858-868.
- Garlind A., Brauner A., Hojberg B., Basun H., et Schultzberg M. Soluble interleukin-1 receptor type II levels are elevated in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease patients. *Brain Res.* 1999, 826: 112-116.
- Ge S., Song L., Serwanski D. R., Kuziel W. A., et Pachter J. S. Transcellular transport of CCL2 across brain microvascular endothelial cells. *J Neurochem.* 2008, 104: 1219-1232.
- Geick A., Eichelbaum M., et Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol.Chem.* 2001, 276: 14581-14587.
- Gerard C. et Rollins B. J. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001, 2: 108-115.
- Giaid A., Gibson S. J., Ibrahim B. N., Legon S., Bloom S. R., Yanagisawa M., Masaki T., Varndell I. M., et Polak J. M. Endothelin 1, an endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1989, 86: 7634-7638.
- Girouard H. et Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl.Physiol* 2006, 100: 328-335.
- Gomez-Garre D., Guerra M., Gonzalez E., Lopez-Farre A., Riesco A., Caramelo C., Escanero J., et Egidio J. Aggregation of human polymorphonuclear leukocytes by endothelin: role of platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol.* 1992, 224: 167-172.
- Goralski K. B., Hartmann G., Piquette-Miller M., et Renton K. W. Downregulation of mdr1a expression in the brain and liver during CNS inflammation alters the in vivo disposition of digoxin. *Br.J.Pharmacol.* 2003, 139: 35-48.
- Gordon G. R., Mulligan S. J., et MacVicar B. A. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 2007, 55: 1214-1221.
- Green J. A. et Friedland J. S. Astrocyte-leucocyte interactions and the mechanisms regulating matrix degradation in CNS tuberculosis. *Biochem.Soc.Trans.* 2007, 35: 686-688.
- Greenwood J. Characterization of a rat retinal endothelial cell culture and the expression of P-glycoprotein in brain and retinal endothelium in vitro. *J Neuroimmunol.* 1992, 39: 123-132.
- Griffin W. S., Stanley L. C., Ling C., White L., MacLeod V., Perrot L. J., White C. L., III, et Araoz C. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86: 7611-7615.
- Groothuis D. R., Vriesendorp F. J., Kupfer B., Warnke P. C., Lapin G. D., Kuruvilla A., Vick N. A., Mikhael M. A., et Patlak C. S. Quantitative measurements of capillary transport in human brain tumors by computed tomography. *Ann.Neurol.* 1991, 30: 581-588.
- Guillemin G. J. et Brew B. J. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc.Biol.* 2004, 75: 388-397.

- Hagenbuch B., Gao B., et Meier P. J. Transport of xenobiotics across the blood-brain barrier. *News Physiol Sci.* 2002, 17: 231-234.
- Hama T., Miyamoto M., Tsukui H., Nishio C., et Hatanaka H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Neurosci.Lett.* 1989, 104: 340-344.
- Hans G., Deseure K., et Adriaensen H. Endothelin-1-induced pain and hyperalgesia: a review of pathophysiology, clinical manifestations and future therapeutic options. *Neuropeptides* 2008, 42: 119-132.
- Harland S. P., Kuc R. E., Pickard J. D., et Davenport A. P. Characterization of endothelin receptors in human brain cortex, gliomas, and meningiomas. *J Cardiovasc.Pharmacol.* 1995, 26 Suppl 3: S408-S411.
- Harland S. P., Kuc R. E., Pickard J. D., et Davenport A. P. Expression of endothelin(A) receptors in human gliomas and meningiomas, with high affinity for the selective antagonist PD156707. *Neurosurgery* 1998, 43: 890-898.
- Hartz A. M., Bauer B., Fricker G., et Miller D. S. Rapid regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier by endothelin-1. *Mol.Pharmacol.* 2004, 66: 387-394.
- Hartz A. M., Bauer B., Fricker G., et Miller D. S. Rapid modulation of P-glycoprotein-mediated transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Mol.Pharmacol.* 2006, 69: 462-470.
- Hasselblatt M., Kamrowski-Kruck H., Jensen N., Schilling L., Kratzin H., Siren A. L., et Ehrenreich H. ETA and ETB receptor antagonists synergistically increase extracellular endothelin-1 levels in primary rat astrocyte cultures. *Brain Res.* 1998, 785: 253-261.
- Haufschild T., Shaw S. G., Kesselring J., et Flammer J. Increased endothelin-1 plasma levels in patients with multiple sclerosis. *J Neuroophthalmol.* 2001, 21: 37-38.
- Hawkins B. T. et Davis T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol.Rev.* 2005, 57: 173-185.
- Hawkins R. A., O'Kane R. L., Simpson I. A., et Vina J. R. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J.Nutr.* 2006, 136: 218S-226S.
- Hayashi K., Nakao S., Nakaoka R., Nakagawa S., Kitagawa N., et Niwa M. Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul.Pept.* 2004, 123: 77-83.
- Hazzalin C. A. et Mahadevan L. C. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev.Mol Cell Biol.* 2002, 3: 30-40.
- He S., Prasanna G., et Yorio T. Endothelin-1-mediated signaling in the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in astrocytes. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci* 2007, 48: 3737-3745.
- Hebert V. Y., Crenshaw B. L., Romanoff R. L., Ekshyyan V. P., et Dugas T. R. Effects of HIV drug combinations on endothelin-1 and vascular cell proliferation. *Cardiovasc.Toxicol.* 2004, 4: 117-131.
- Herman I. M. et D'Amore P. A. Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *J Cell Biol.* 1985, 101: 43-52.
- Hjelle J. T., Baird-Lambert J., Cardinale G., Specor S., et Udenfriend S. Isolated microvessels: the blood-brain barrier in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978, 75: 4544-4548.
- Hoang D., Macarthur H., Gardner A., et Westfall T. C. Endothelin-induced modulation of neuropeptide Y and norepinephrine release from the rat mesenteric bed. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol* 2002, 283: H1523-H1530.

- Hofman F. M., Chen P., Incardona F., Zidovetzki R., et Hinton D. R. HIV-1 tat protein induces the production of interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 1999, 94: 28-39.
- Hofman F. M., Chen P., Jeyaseelan R., Incardona F., Fisher M., et Zidovetzki R. Endothelin-1 induces production of the neutrophil chemotactic factor interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells. *Blood* 1998, 92: 3064-3072.
- Holash J. A., Harik S. I., Perry G., et Stewart P. A. Barrier properties of testis microvessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90: 11069-11073.
- Holmes W. E., Lee J., Kuang W. J., Rice G. C., et Wood W. I. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991, 253: 1278-1280.
- Hori S., Ohtsuki S., Hosoya K., Nakashima E., et Terasaki T. A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem.* 2004, 89: 503-513.
- Hsu S. I., Cohen D., Kirschner L. S., Lothstein L., Hartstein M., et Horwitz S. B. Structural analysis of the mouse *mdr1a* (P-glycoprotein) promoter reveals the basis for differential transcript heterogeneity in multidrug-resistant J774.2 cells. *Mol Cell Biol.* 1990, 10: 3596-3606.
- Hu Z., Jin S., et Scotto K. W. Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF- κ B and Sp1. *J Biol.Chem.* 2000, 275: 2979-2985.
- Huai-Yun H., Secrest D. T., Mark K. S., Carney D., Brandquist C., Elmquist W. F., et Miller D. W. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1998, 243: 816-820.
- Huang D., Tani M., Wang J., Han Y., He T. T., Weaver J., Charo I. F., Tuohy V. K., Rollins B. J., et Ransohoff R. M. Pertussis toxin-induced reversible encephalopathy dependent on monocyte chemoattractant protein-1 overexpression in mice. *J Neurosci.* 2002, 22: 10633-10642.
- Huang D. R., Wang J., Kivisakk P., Rollins B. J., et Ransohoff R. M. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp.Med* 2001a, 193: 713-726.
- Huang J., Upadhyay U. M., et Tamargo R. J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg.Neurol.* 2006, 66: 232-245.
- Huang S. C., Lee M. C., Wei C. K., et Huang S. M. Endothelin receptors in human and guinea-pig gallbladder muscle. *Regul.Pept.* 2001b, 98: 145-153.
- Hughes S. et Chan-Ling T. Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina in vivo. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci* 2004, 45: 2795-2806.
- Hung L. W., Wang I. X., Nikaido K., Liu P. Q., Ames G. F., et Kim S. H. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 1998, 396: 703-707.
- Hynynen M. M. et Khalil R. A. The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. *Recent Patents.Cardiovasc.Drug Discov.* 2006, 1: 95-108.
- Imhof B. A., Engelhardt B., et Vadas M. Novel mechanisms of the transendothelial migration of leukocytes. *Trends Immunol.* 2001, 22: 411-414.
- Inoue A., Yanagisawa M., Kimura S., Kasuya Y., Miyauchi T., Goto K., et Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1989, 86: 2863-2867.

- Ishihara H., Kubota H., Lindberg R. L., Leppert D., Gloor S. M., Errede M., Virgintino D., Fontana A., Yonekawa Y., et Frei K. Endothelial Cell Barrier Impairment Induced by Glioblastomas and Transforming Growth Factor beta2 Involves Matrix Metalloproteinases and Tight Junction Proteins. *J Neuropathol.Exp.Neurol.* 2008,
- Ishizuka T., Takamizawa-Matsumoto M., Suzuki K., et Kurita A. Endothelin-1 enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor alpha-stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 1999, 369: 237-245.
- Itoh Y., Yanagisawa M., Ohkubo S., Kimura C., Kosaka T., Inoue A., Ishida N., Mitsui Y., Onda H., Fujino M., et . Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS Lett.* 1988, 231: 440-444.
- Jack C. S., Arbour N., Manusow J., Montgrain V., Blain M., McCrea E., Shapiro A., et Antel J. P. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol.* 2005, 175: 4320-4330.
- Jette L., Tetu B., et Beliveau R. High levels of P-glycoprotein detected in isolated brain capillaries. *Biochim.Biophys.Acta* 1993, 1150: 147-154.
- Jiang B., Hebert V. Y., Zavec J. H., et Dugas T. R. Antiretrovirals induce direct endothelial dysfunction in vivo. *J Acquir.Immune.Defic.Syndr.* 2006, 42: 391-395.
- Johnstrom P., Fryer T. D., Richards H. K., Harris N. G., Barret O., Clark J. C., Pickard J. D., et Davenport A. P. Positron emission tomography using 18F-labelled endothelin-1 reveals prevention of binding to cardiac receptors owing to tissue-specific clearance by ET B receptors in vivo. *Br.J Pharmacol.* 2005, 144: 115-122.
- Josserand V., Pelerin H., de Bruin B., Jegu B., Kuhnast B., Hinnen F., Duconge F., Boisgard R., Beuvon F., Chassoux F., umas-Duport C., Ezan E., Dolle F., Mabondzo A., et Tavitian B. Evaluation of drug penetration into the brain: a double study by in vivo imaging with positron emission tomography and using an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2006, 316: 79-86.
- Juliano R. L. et Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim.Biophys.Acta* 1976, 455: 152-162.
- Kacem K., Lacombe P., Seylaz J., et Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 1998, 23: 1-10.
- Kallela M., Farkkila M., Saijonmaa O., et Fyhrquist F. Endothelin in migraine patients. *Cephalalgia* 1998, 18: 329-332.
- Karram K., Chatterjee N., et Trotter J. NG2-expressing cells in the nervous system: role of the proteoglycan in migration and glial-neuron interaction. *J Anat.* 2005, 207: 735-744.
- Kastin A. J., Pan W., Maness L. M., et Banks W. A. Peptides crossing the blood-brain barrier: some unusual observations. *Brain Res.* 1999, 848: 96-100.
- Kauffmann H. M., Vorderstemann B., et Schrenk D. Basal expression of the rat, but not of the human, multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene is mediated by CBF/NF-Y and Sp1 promoter-binding sites. *Toxicology* 2001, 167: 25-35.
- Kaul M., Garden G. A., et Lipton S. A. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* 2001, 410: 988-994.
- Keep R. F., Ennis S. R., Beer M. E., et Betz A. L. Developmental changes in blood-brain barrier potassium permeability in the rat: relation to brain growth. *J Physiol* 1995, 488 (Pt 2): 439-448.

- Kelner G. S., Kennedy J., Bacon K. B., Kleyensteuber S., Largaespada D. A., Jenkins N. A., Copeland N. G., Bazan J. F., Moore K. W., Schall T. J., et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994, 266: 1395-1399.
- Kemper E. M., Boogerd W., Thuis I., Beijnen J. H., et van Tellingen O. Modulation of the blood-brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours? *Cancer Treat.Rev.* 2004, 30: 415-423.
- Kido T., Sawamura T., Hoshikawa H., Orleans-Juste P., Denault J. B., Leduc R., Kimura J., et Masaki T. Processing of proendothelin-1 at the C-terminus of big endothelin-1 is essential for proteolysis by endothelin-converting enzyme-1 in vivo. *Eur J Biochem.* 1997, 244: 520-526.
- Kieseier B. C., Kiefer R., Clements J. M., Miller K., Wells G. M., Schweitzer T., Gearing A. J., et Hartung H. P. Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 1998, 121 (Pt 1): 159-166.
- Kim J. H., Kim J. H., Park J. A., Lee S. W., Kim W. J., Yu Y. S., et Kim K. W. Blood-neural barrier: intercellular communication at gliovascular interface. *J.Biochem.Mol.Biol.* 2006, 39: 339-345.
- King J. M., Srivastava K. D., Stefano G. B., Bilfinger T. V., Bahou W. F., et Magazine H. I. Human monocyte adhesion is modulated by endothelin B receptor-coupled nitric oxide release. *J Immunol.* 1997, 158: 880-886.
- Kipp H. et Arias I. M. Intracellular trafficking and regulation of canalicular ATP-binding cassette transporters. *Semin.Liver Dis.* 2000, 20: 339-351.
- Kipp H., Pichetshote N., et Arias I. M. Transporters on demand: intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J Biol.Chem.* 2001, 276: 7218-7224.
- Klein I., Sarkadi B., et Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1999, 1461: 237-262.
- Kniesel U. et Wolburg H. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol.Neurobiol.* 2000, 20: 57-76.
- Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci.* 2008, 13: 2400-2407.
- Kodawara T., Masuda S., Wakasugi H., Uwai Y., Futami T., Saito H., Abe T., et Inu K. Organic anion transporter oatp2-mediated interaction between digoxin and amiodarone in the rat liver. *Pharm.Res.* 2002, 19: 738-743.
- Koyama Y., Baba A., et Matsuda T. Production of monocyte chemoattractant protein-1 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in rat brain is stimulated by intracerebroventricular administration of an endothelin ETB receptor agonist. *Neuroreport* 2007, 18: 1275-1279.
- Koyama Y., Baba A., et Matsuda T. Endothelins stimulate the expression of neurotrophin-3 in rat brain and rat cultured astrocytes. *Neuroscience* 2005a, 136: 425-433.
- Koyama Y., Tsujikawa K., Matsuda T., et Baba A. Endothelin increases expression of exon III- and exon IV-containing brain-derived neurotrophic factor transcripts in cultured astrocytes and rat brain. *J Neurosci.Res.* 2005b, 80: 809-816.
- Kramer-Hammerle S., Rothenaigner I., Wolff H., Bell J. E., et Brack-Werner R. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res.* 2005, 111: 194-213.
- Kubota K., Furuse M., Sasaki H., Sonoda N., Fujita K., Nagafuchi A., et Tsukita S. Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr.Biol.* 1999, 9: 1035-1038.

- Kurihara H., Yoshizumi M., Sugiyama T., Takaku F., Yanagisawa M., Masaki T., Hamaoki M., Kato H., et Yazaki Y. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1989, 159: 1435-1440.
- Kuziel W. A., Morgan S. J., Dawson T. C., Griffin S., Smithies O., Ley K., et Maeda N. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94: 12053-12058.
- Labialle S., Gayet L., Marthinet E., Rigal D., et Baggetto L. G. Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochem.Pharmacol.* 2002, 64: 943-948.
- Ladenheim R. G., Lacroix I., Foignant-Chaverot N., Strosberg A. D., et Couraud P. O. Endothelins stimulate c-fos and nerve growth factor expression in astrocytes and astrocytoma. *J Neurochem.* 1993, 60: 260-266.
- Lampl Y., Fleminger G., Gilad R., Galron R., Sarova-Pinhas I., et Sokolovsky M. Endothelin in cerebrospinal fluid and plasma of patients in the early stage of ischemic stroke. *Stroke* 1997, 28: 1951-1955.
- Lanzrein A. S., Johnston C. M., Perry V. H., Jobst K. A., King E. M., et Smith A. D. Longitudinal study of inflammatory factors in serum, cerebrospinal fluid, and brain tissue in Alzheimer disease: interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor-alpha, the soluble tumor necrosis factor receptors I and II, and alpha1-antichymotrypsin. *Alzheimer Dis.Assoc.Disord.* 1998, 12: 215-227.
- Lattmann T., Hein M., Horber S., Ortmann J., Teixeira M. M., Souza D. G., Haas E., Tornillo L., Munter K., Vetter W., et Barton M. Activation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in host organs during chronic allograft rejection: role of endothelin receptor signaling. *Am J Transplant* 2005, 5: 1042-1049.
- Le Vee M., Gripon P., Stieger B., et Fardel O. Down-regulation of organic anion transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokine interleukin 1beta. *Drug Metab Dispos.* 2008, 36: 217-222.
- Lee G., Babakhanian K., Ramaswamy M., Prat A., Wosik K., et Bendayan R. Expression of the ATP-binding cassette membrane transporter, ABCG2, in human and rodent brain microvessel endothelial and glial cell culture systems. *Pharm.Res.* 2007, 24: 1262-1274.
- Lee G. et Bendayan R. Functional expression and localization of P-glycoprotein in the central nervous system: relevance to the pathogenesis and treatment of neurological disorders. *Pharm.Res.* 2004, 21: 1313-1330.
- Lee G. et Piquette-Miller M. Influence of IL-6 on MDR and MRP-mediated multidrug resistance in human hepatoma cells. *Can.J Physiol Pharmacol.* 2001, 79: 876-884.
- Lee J. T., Jr., Steelman L. S., et McCubrey J. A. Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2004, 64: 8397-8404.
- Lee M. E., de la Monte S. M., Ng S. C., Bloch K. D., et Quertermous T. Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J Clin.Invest* 1990, 86: 141-147.
- Lee M. E., Dhady M. S., Temizer D. H., Clifford J. A., Yoshizumi M., et Quertermous T. Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun. *J Biol.Chem.* 1991, 266: 19034-19039.
- Lehmann J. M., McKee D. D., Watson M. A., Willson T. M., Moore J. T., et Kliewer S. A. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin.Invest* 1998, 102: 1016-1023.
- Leslie E. M., Deeley R. G., et Cole S. P. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 2005, 204: 216-237.

- Li A., Dubey S., Varney M. L., Dave B. J., et Singh R. K. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol.* 2003, 170: 3369-3376.
- Lieberman A. P., Pitha P. M., Shin H. S., et Shin M. L. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86: 6348-6352.
- Liebner S., Fischmann A., Rascher G., Duffner F., Grote E. H., Kalbacher H., et Wolburg H. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 2000, 100: 323-331.
- Liu X., Bolteus A. J., Balkin D. M., Henschel O., et Bordey A. GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia* 2006, 54: 394-410.
- Llorente L., Richaud-Patin Y., az-Borjon A., varado de la Barrera C., Jakez-Ocampo J., de la Fuente H., Gonzalez-Amaro R., et az-Jouanen E. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part I: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients might influence disease outcome. *Joint Bone Spine* 2000, 67: 30-39.
- Lopez Farre A., Riesco A., Espinosa G., Digiuni E., Cernadas M. R., Alvarez V., Monton M., Rivas F., Gallego M. J., Egado J., et . Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation* 1993, 88: 1166-1171.
- Lopez-Farre A., Caramelo C., Esteban A., Alberola M. L., Millas I., Monton M., et Casado S. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995, 91: 2080-2088.
- Loscher W. et Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat.Rev.Neurosci.* 2005a, 6: 591-602.
- Loscher W. et Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog.Neurobiol.* 2005b, 76: 22-76.
- Lu B., Pang P. T., et Woo N. H. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev.Neurosci.* 2005, 6: 603-614.
- Lucas S. M., Rothwell N. J., et Gibson R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br.J Pharmacol.* 2006, 147 Suppl 1: S232-S240.
- Lukacs N. W., Strieter R. M., Elnor V., Evanoff H. L., Burdick M. D., et Kunkel S. L. Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood* 1995, 86: 2767-2773.
- MacCumber M. W., Ross C. A., et Snyder S. H. Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990, 87: 2359-2363.
- Mach B., Steimle V., Martinez-Soria E., et Reith W. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu.Rev.Immunol.* 1996, 14: 301-331.
- Madden M. J., Morrow C. S., Nakagawa M., Goldsmith M. E., Fairchild C. R., et Cowan K. H. Identification of 5' and 3' sequences involved in the regulation of transcription of the human *mdr1* gene in vivo. *J Biol.Chem.* 1993, 268: 8290-8297.
- Mallat A., Preaux A. M., Serradeil-Le Gal C., Raufaste D., Gallois C., Brenner D. A., Bradham C., Maclouf J., Iourgenko V., Fouassier L., Dhumeaux D., Mavier P., et Lotersztajn S. Growth inhibitory properties of endothelin-1 in activated human hepatic stellate cells: a cyclic adenosine monophosphate-mediated pathway. Inhibition of both extracellular signal-regulated kinase and c-Jun kinase and upregulation of endothelin B receptors. *J Clin.Invest* 1996, 98: 2771-2778.

- Man S., Ubogu E. E., et Ransohoff R. M. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain Pathol* 2007, 17: 243-250.
- Mangahas C. R., la Cruz G. V., Friedman-Jimenez G., et Jamal S. Endothelin-1 induces CXCL1 and CXCL8 secretion in human melanoma cells. *J.Invest Dermatol.* 2005, 125: 307-311.
- Marsden P. A. et Brenner B. M. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am J Physiol* 1992, 262: C854-C861.
- Martinez G., Carnazza M. L., Di Giacomo C., Sorrenti V., Avitabile M., et Vanella A. GFAP, S-100 and vimentin proteins in rat after cerebral post-ischemic reperfusion. *Int.J.Dev.Neurosci.* 1998, 16: 519-526.
- Marx F., Blasko I., Pavelka M., et Grubeck-Loebenstein B. The possible role of the immune system in Alzheimer's disease. *Exp.Gerontol.* 1998, 33: 871-881.
- Marziali G., Perrotti E., Ilari R., Testa U., Coccia E. M., et Battistini A. Transcriptional regulation of the ferritin heavy-chain gene: the activity of the CCAAT binding factor NF-Y is modulated in heme-treated Friend leukemia cells and during monocyte-to-macrophage differentiation. *Mol Cell Biol.* 1997, 17: 1387-1395.
- Marzolini C., Paus E., Buclin T., et Kim R. B. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2004, 75: 13-33.
- Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol.Sci* 2004, 25: 219-224.
- Masaoka H., Suzuki R., Hirata Y., Emori T., Marumo F., et Hirakawa K. Raised plasma endothelin in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet* 1989, 2: 1402-
- Matsumoto T., Yokoi K., Mukaida N., Harada A., Yamashita J., Watanabe Y., et Matsushima K. Pivotal role of interleukin-8 in the acute respiratory distress syndrome and cerebral reperfusion injury. *J Leukoc.Biol.* 1997, 62: 581-587.
- Matsushima K., Larsen C. G., DuBois G. C., et Oppenheim J. J. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp.Med* 1989, 169: 1485-1490.
- Mayer R., Kartenbeck J., Buchler M., Jedlitschky G., Leier I., et Keppler D. Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J Cell Biol.* 1995, 131: 137-150.
- McCarron R. M., Wang L., Stanimirovic D. B., et Spatz M. Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci.Lett.* 1993, 156: 31-34.
- McCarthy K. M., Skare I. B., Stankewich M. C., Furuse M., Tsukita S., Rogers R. A., Lynch R. D., et Schneeberger E. E. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 1996, 109 (Pt 9): 2287-2298.
- McCoy C., Smith D. E., et Cornwell M. M. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the MDR1 promoter is mediated by EGR1. *Mol Cell Biol.* 1995, 15: 6100-6108.
- McGeer P. L. et McGeer E. G. Inflammation of the brain in Alzheimer's disease: implications for therapy. *J Leukoc.Biol.* 1999, 65: 409-415.
- McRae M. P., Brouwer K. L., et Kashuba A. D. Cytokine regulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev.* 2003, 35: 19-33.
- Megard I., Garrigues A., Orlowski S., Jorajuria S., Clayette P., Ezan E., et Mabondzo A. A co-culture-based model of human blood-brain barrier: application to active transport of indinavir and in vivo-in vitro correlation. *Brain Res.* 2002, 927: 153-167.

- Middleton J., Neil S., Wintle J., Clark-Lewis I., Moore H., Lam C., Auer M., Hub E., et Rot A. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 1997, 91: 385-395.
- Middleton J., Patterson A. M., Gardner L., Schmutz C., et Ashton B. A. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 2002, 100: 3853-3860.
- Mikkaichi T., Suzuki T., Onogawa T., Tanemoto M., Mizutamari H., Okada M., Chaki T., Masuda S., Tokui T., Eto N., Abe M., Satoh F., Unno M., Hishinuma T., Inui K., Ito S., Goto J., et Abe T. Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004, 101: 3569-3574.
- Milane A., Fernandez C., Vautier S., Bensimon G., Meininger V., et Farinotti R. Minocycline and riluzole brain disposition: interactions with p-glycoprotein at the blood-brain barrier. *J Neurochem.* 2007, 103: 164-173.
- Miller A. G., Smith D. G., Bhat M., et Nagaraj R. H. Glyoxalase I is critical for human retinal capillary pericyte survival under hyperglycemic conditions. *J Biol.Chem.* 2006, 281: 11864-11871.
- Minami M., Kimura M., Iwamoto N., et Arai H. Endothelin-1-like immunoreactivity in cerebral cortex of Alzheimer-type dementia. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 1995, 19: 509-513.
- Modesti P. A., Cecioni I., Costoli A., Poggesi L., Galanti G., et Seneri G. G. Renal endothelin in heart failure and its relation to sodium excretion. *Am Heart J* 2000, 140: 617-622.
- Molet S., Furukawa K., Maghazechi A., Hamid Q., et Giaid A. Chemokine- and cytokine-induced expression of endothelin 1 and endothelin-converting enzyme 1 in endothelial cells. *J Allergy Clin.Immunol.* 2000, 105: 333-338.
- Moore K. L., Eaton S. F., Lyons D. E., Lichenstein H. S., Cummings R. D., et McEver R. P. The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine. *J Biol.Chem.* 1994, 269: 23318-23327.
- Mordelet E., Davies H. A., Hillyer P., Romero I. A., et Male D. Chemokine transport across human vascular endothelial cells. *Endothelium* 2007, 14: 7-15.
- Morgan L., Shah B., Rivers L. E., Barden L., Groom A. J., Chung R., Higazi D., Desmond H., Smith T., et Staddon J. M. Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neuroscience* 2007, 147: 664-673.
- Morgenstern D. A., Asher R. A., Naidu M., Carlstedt T., Levine J. M., et Fawcett J. W. Expression and glycanation of the NG2 proteoglycan in developing, adult, and damaged peripheral nerve. *Mol Cell Neurosci.* 2003, 24: 787-802.
- Morishita R., Nagata K., Ito H., Ueda H., Asano M., Shinohara H., Kato K., et Asano T. Expression of smooth muscle cell-specific proteins in neural progenitor cells induced by agonists of G protein-coupled receptors and transforming growth factor-beta. *J Neurochem.* 2007, 101: 1031-1040.
- Muller N. et Ackenheil M. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 1998, 22: 1-33.
- Muller W. A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2003, 24: 327-334.
- Muruganandam A., Herx L. M., Monette R., Durkin J. P., et Stanimirovic D. B. Development of immortalized human cerebrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. *FASEB J* 1997, 11: 1187-1197.
- Naidoo V., Naidoo S., et Raidoo D. M. Immunolocalisation of endothelin-1 in human brain. *J.Chem.Neuroanat.* 2004, 27: 193-200.

- Nakagawa S., Deli M. A., Nakao S., Honda M., Hayashi K., Nakaoke R., Kataoka Y., et Niwa M. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol. Neurobiol.* 2007, 27: 687-694.
- Nakamura K., Williams I. R., et Kupper T. S. Keratinocyte-derived monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): analysis in a transgenic model demonstrates MCP-1 can recruit dendritic and Langerhans cells to skin. *J Invest Dermatol.* 1995, 105: 635-643.
- Narushima I., Kita T., Kubo K., Yonetani Y., Momochi C., Yoshikawa I., Ohno N., et Nakashima T. Highly enhanced permeability of blood-brain barrier induced by repeated administration of endothelin-1 in dogs and rats. *Pharmacol. Toxicol.* 2003, 92: 21-26.
- Nehls V. et Drenckhahn D. Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *J Cell Biol.* 1991, 113: 147-154.
- Ngiam N., Post M., et Kavanagh B. P. Early growth response factor-1 in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, 293: L1089-L1091.
- Nies A. T., Jedlitschky G., Konig J., Herold-Mende C., Steiner H. H., Schmitt H. P., et Keppler D. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* 2004, 129: 349-360.
- Nilsson D., Wackenfors A., Gustafsson L., Ugander M., Ingemansson R., Edvinsson L., et Malmstro M. PKC and MAPK signalling pathways regulate vascular endothelin receptor expression. *Eur J Pharmacol.* 2008, 580: 190-200.
- Nishiyama A., Yang Z., et Butt A. Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat.* 2005, 207: 687-693.
- Noske W., Hensen J., et Wiederholt M. Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1997, 235: 551-552.
- Notenboom S., Miller D. S., Smits P., Russel F. G., et Masereeuw R. Role of NO in endothelin-regulated drug transport in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002, 282: F458-F464.
- Nottet H. S., Persidsky Y., Sasseville V. G., Nukuna A. N., Bock P., Zhai Q. H., Sharer L. R., McComb R. D., Swindells S., Soderland C., et Gendelman H. E. Mechanisms for the transendothelial migration of HIV-1-infected monocytes into brain. *J Immunol.* 1996, 156: 1284-1295.
- Oby E. et Janigro D. The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia* 2006, 47: 1761-1774.
- Ogretmen B. et Safa A. R. Negative regulation of MDR1 promoter activity in MCF-7, but not in multidrug resistant MCF-7/Adr, cells by cross-coupled NF-kappa B/p53 and c-Fos transcription factors and their interaction with the CAAT region. *Biochemistry* 1999, 38: 2189-2199.
- Ogretmen B. et Safa A. R. Identification and characterization of the MDR1 promoter-enhancing factor 1 (MEF1) in the multidrug resistant HL60/VCR human acute myeloid leukemia cell line. *Biochemistry* 2000, 39: 194-204.
- Ohga T., Uchiumi T., Makino Y., Koike K., Wada M., Kuwano M., et Kohno K. Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J Biol. Chem.* 1998, 273: 5997-6000.
- Ohtsuki S. et 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: 1745-1758.
- Okada Y., Copeland B. R., Hamann G. F., Koziol J. A., Cheresch D. A., et del Zoppo G. J. Integrin alpha v beta 3 is expressed in selected microvessels after focal cerebral ischemia. *Am J Pathol* 1996, 149: 37-44.

- Okazawa M., Shiraki T., Ninomiya H., Kobayashi S., et Masaki T. Endothelin-induced apoptosis of A375 human melanoma cells. *J Biol.Chem.* 1998, 273: 12584-12592.
- Oku H., Fukuhara M., Komori A., Okuno T., Sugiyama T., et Ikeda T. Endothelin-1 (ET-1) causes death of retinal neurons through activation of nitric oxide synthase (NOS) and production of superoxide anion. *Exp.Eye Res.* 2008, 86: 118-130.
- Oldendorf W. H., Cornford M. E., et Brown W. J. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann.Neurol.* 1977, 1: 409-417.
- Owens T., Babcock A. A., Millward J. M., et Toft-Hansen H. Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 2005, 48: 178-184.
- Papadopoulos M. C., Saadoun S., Davies D. C., et Bell B. A. Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema. *Br.J Neurosurg.* 2001, 15: 101-108.
- Pardridge W. M. Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol.* 1999, 5: 556-569.
- Pardridge W. M., Golden P. L., Kang Y. S., et Bickel U. Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. *J Neurochem.* 1997, 68: 1278-1285.
- Paris D., Humphrey J., Quadros A., Patel N., Crescentini R., Crawford F., et Mullan M. Vasoactive effects of A beta in isolated human cerebrovessels and in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: role of inflammation. *Neurol.Res.* 2003, 25: 642-651.
- Pawlik A., Baskiewicz-Masiuk M., Machalinski B., Safranow K., et Gawronska-Szklarz B. Involvement of P-glycoprotein in the release of cytokines from peripheral blood mononuclear cells treated with methotrexate and dexamethasone. *J Pharm.Pharmacol.* 2005, 57: 1421-1425.
- Pei Q. L., Kobayashi Y., Tanaka Y., Taguchi Y., Higuchi K., Kaito M., Ma N., Semba R., Kamisako T., et Adachi Y. Increased expression of multidrug resistance-associated protein 1 (mrp1) in hepatocyte basolateral membrane and renal tubular epithelia after bile duct ligation in rats. *Hepatol.Res.* 2002, 22: 58-64.
- Peng K. C., Cluzeaud F., Bens M., Van Huyen J. P., Wioland M. A., Lacave R., et Vandewalle A. Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. *J Histochem.Cytochem.* 1999, 47: 757-768.
- Perriere N., Demeuse P., Garcia E., Regina A., Debray M., Andreux J. P., Couvreur P., Scherrmann J. M., Tamsamani J., Couraud P. O., Deli M. A., et Roux F. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem.* 2005, 93: 279-289.
- Persidsky Y., Ramirez S. H., Haorah J., et Kanmogne G. D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune.Pharmacol.* 2006, 1: 223-236.
- Pestka S., Krause C. D., Sarkar D., Walter M. R., Shi Y., et Fisher P. B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 2004, 22: 929-979.
- Peterlana D., Puccetti A., Caramaschi P., Biasi D., Beri R., Simeoni S., Corrocher R., et Lunardi C. Endothelin-1 serum levels correlate with MCP-1 but not with homocysteine plasma concentration in patients with systemic sclerosis. *Scand.J Rheumatol.* 2006, 35: 133-137.
- Petty M. A. et Lo E. H. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog.Neurobiol.* 2002, 68: 311-323.
- Petty M. A. et Wettstein J. G. Elements of cerebral microvascular ischaemia. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 2001, 36: 23-34.

- Pflug B. R., Zheng H., Udan M. S., D'Antonio J. M., Marshall F. F., Brooks J. D., et Nelson J. B. Endothelin-1 promotes cell survival in renal cell carcinoma through the ET(A) receptor. *Cancer Lett.* 2007, 246: 139-148.
- Pittman Q. J. Endothelin-an emerging role in proinflammatory pathways in brain. *Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 2006, 290: R162-R163.
- Polli J. W., Jarrett J. L., Studenberg S. D., Humphreys J. E., Dennis S. W., Brouwer K. R., et Woolley J. L. Role of P-glycoprotein on the CNS disposition of amprenavir (141W94), an HIV protease inhibitor. *Pharm.Res.* 1999, 16: 1206-1212.
- Pollmacher T., Haack M., Schuld A., Reichenberg A., et Yirmiya R. Low levels of circulating inflammatory cytokines--do they affect human brain functions? *Brain Behav.Immun.* 2002, 16: 525-532.
- Pollock D. M. Endothelin, angiotensin, and oxidative stress in hypertension. *Hypertension* 2005, 45: 477-480.
- Porcheray F., Viaud S., Rimaniol A. C., Leone C., Samah B., reuddle-Bosquet N., Dormont D., et Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin.Exp.Immunol.* 2005, 142: 481-489.
- Potschka H., Fedrowitz M., et Loscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 2003, 306: 124-131.
- Potvin S., Stip E., Sepehry A. A., Gendron A., Bah R., et Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol.Psychiatry* 2008, 63: 801-808.
- Puffenberger E. G., Hosoda K., Washington S. S., Nakao K., deWit D., Yanagisawa M., et Chakravart A. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 1994, 79: 1257-1266.
- Quan N. et Banks W. A. Brain-immune communication pathways. *Brain Behav.Immun.* 2007, 21: 727-735.
- Radeva G., Perabo J., et Sharom F. J. P-Glycoprotein is localized in intermediate-density membrane microdomains distinct from classical lipid rafts and caveolar domains. *FEBS J* 2005, 272: 4924-4937.
- Rajagopalan S., Pfenninger D., Kehrer C., Chakrabarti A., Somers E., Pavlic R., Mukherjee D., Brook R., D'Alecy L. G., et Kaplan M. J. Increased asymmetric dimethylarginine and endothelin 1 levels in secondary Raynaud's phenomenon: implications for vascular dysfunction and progression of disease. *Arthritis Rheum.* 2003, 48: 1992-2000.
- Randle R. A., Raguz S., Higgins C. F., et Yague E. Role of the highly structured 5'-end region of MDR1 mRNA in P-glycoprotein expression. *Biochem.J* 2007, 406: 445-455.
- Rao V. R., Krishnamoorthy R. R., et Yorio T. Endothelin-1 mediated regulation of extracellular matrix collagens in cells of human lamina cribrosa. *Exp.Eye Res.* 2008,
- Rautio J., Humphreys J. E., Webster L. O., Balakrishnan A., Keogh J. P., Kunta J. R., Serabjit-Singh C. J., et Polli J. W. In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. *Drug Metab Dispos.* 2006, 34: 786-792.
- REED D. J. et WOODBURY D. M. KINETICS OF MOVEMENT OF IODIDE, SUCROSE, INULIN AND RADIO-IODINATED SERUM ALBUMIN IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND CEREBROSPINAL FLUID OF THE RAT. *J Physiol* 1963, 169: 816-850.
- Rege T. A. et Hagood J. S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J* 2006, 20: 1045-1054.

- Regina A., Koman A., Piciotti M., El Hafny B., Center M. S., Bergmann R., Couraud P. O., et Roux F. Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem.* 1998, 71: 705-715.
- Richaud-Patin Y., Soto-Vega E., Jabez-Ocampo J., et Llorente L. P-glycoprotein in autoimmune diseases. *Autoimmun.Rev.* 2004, 3: 188-192.
- Righi M., Mori L., De Libero G., Sironi M., Biondi A., Mantovani A., Donini S. D., et Ricciardi-Castagnoli P. Monokine production by microglial cell clones. *Eur J Immunol.* 1989, 19: 1443-1448.
- Robinson S. C., Scott K. A., et Balkwill F. R. Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha. *Eur J Immunol.* 2002, 32: 404-412.
- Roder K., Wolf S. S., Larkin K. J., et Schweizer M. Interaction between the two ubiquitously expressed transcription factors NF-Y and Sp1. *Gene* 1999, 234: 61-69.
- Rogers S. D., Demaster E., Catton M., Ghilardi J. R., Levin L. A., Maggio J. E., et Mantyh P. W. Expression of endothelin-B receptors by glia in vivo is increased after CNS injury in rats, rabbits, and humans. *Exp.Neurol.* 1997, 145: 180-195.
- Rohlf C. et Glazer R. I. Regulation of the MDR1 promoter by cyclic AMP-dependent protein kinase and transcription factor Sp1. *Int.J Oncol.* 1998, 12: 383-386.
- Rojo L. E., Fernandez J. A., Maccioni A. A., Jimenez J. M., et Maccioni R. B. Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch.Med Res.* 2008, 39: 1-16.
- Rolinski B., Heigermoser A., Lederer E., Bogner J. R., Loch O., et Goebel F. D. Endothelin-1 is elevated in the cerebrospinal fluid of HIV-infected patients with encephalopathy. *Infection* 1999, 27: 244-247.
- Rollins B. J. Chemokines. *Blood* 1997, 90: 909-928.
- Rollins B. J., Stier P., Ernst T., et Wong G. G. The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol Cell Biol.* 1989, 9: 4687-4695.
- Ronaldson P. T. et Bendayan R. HIV-1 viral envelope glycoprotein gp120 triggers an inflammatory response in cultured rat astrocytes and regulates the functional expression of P-glycoprotein. *Mol.Pharmacol.* 2006, 70: 1087-1098.
- Roninson I. B., Chin J. E., Choi K. G., Gros P., Housman D. E., Fojo A., Shen D. W., Gottesman M. M., et Pastan I. Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83: 4538-4542.
- Rothwell N. J., Luheshi G., et Toulmond S. Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology, and pathology. *Pharmacol.Ther.* 1996, 69: 85-95.
- Rothwell N. J. et Luheshi G. N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.* 2000, 23: 618-625.
- Roy B. et Lee A. S. Transduction of calcium stress through interaction of the human transcription factor CBF with the proximal CCAAT regulatory element of the grp78/BiP promoter. *Mol Cell Biol.* 1995, 15: 2263-2274.
- Rubanyi G. M. et Polokoff M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol.Rev.* 1994, 46: 325-415.
- Rubin L. L. et Staddon J. M. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu.Rev.Neurosci.* 1999, 22: 11-28.
- Russell F. D. et Davenport A. P. Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br.J Pharmacol.* 1999, 126: 391-398.

- Ryu J., Lee C. W., Shin J. A., Park C. S., Kim J. J., Park S. J., et Han K. H. FcγRIIIa mediates C-reactive protein-induced inflammatory responses of human vascular smooth muscle cells by activating NADPH oxidase 4. *Cardiovasc.Res.* 2007, 75: 555-565.
- Sababi M., Borga O., et Hultkvist-Bengtsson U. The role of P-glycoprotein in limiting intestinal regional absorption of digoxin in rats. *Eur J Pharm.Sci* 2001, 14: 21-27.
- Saban R., Simpson C., Vadigepalli R., Memet S., Dozmorov I., et Saban M. R. Bladder inflammatory transcriptome in response to tachykinins: neurokinin 1 receptor-dependent genes and transcription regulatory elements. *BMC.Urol.* 2007, 7: 7-
- Sacktor N. The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Neurovirol.* 2002, 8 Suppl 2: 115-121.
- Saengkhae C., Salerno M., Ades D., Siove A., Le Moyec L., Migonney V., et Garnier-Suillerot A. Ability of carbazole salts, inhibitors of Alzheimer beta-amyloid fibril formation, to cross cellular membranes. *Eur.J Pharmacol.* 2007, 559: 124-131.
- Saetre P., Emilsson L., Axelsson E., Kreuger J., Lindholm E., et Jazin E. Inflammation-related genes up-regulated in schizophrenia brains. *BMC.Psychiatry* 2007, 7: 46-
- Sakurai T., Yanagisawa M., et Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol.Sci* 1992, 13: 103-108.
- Sakurai T., Yanagisawa M., Takawa Y., Miyazaki H., Kimura S., Goto K., et Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990, 348: 732-735.
- Sampaio A. L., Rae G. A., et Henriques M. G. Effects of endothelin ETA receptor antagonism on granulocyte and lymphocyte accumulation in LPS-induced inflammation. *J Leukoc.Biol.* 2004, 76: 210-216.
- Sampaio A. L., Rae G. A., et Henriques M. M. Role of endothelins on lymphocyte accumulation in allergic pleurisy. *J Leukoc.Biol.* 2000, 67: 189-195.
- Satoh T., Nakamura S., Taga T., Matsuda T., Hirano T., Kishimoto T., et Kaziro Y. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol Cell Biol.* 1988, 8: 3546-3549.
- Savarin-Vuaillet C. et Ransohoff R. M. Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? *Neurotherapeutics.* 2007, 4: 590-601.
- Scheffer G. L., Pijnenborg A. C., Smit E. F., Muller M., Postma D. S., Timens W., van der, V, de Vries E. G., et Scheper R. J. Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *J Clin.Pathol* 2002, 55: 332-339.
- Schindowski K., Belarbi K., et Buee L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav.* 2008, 7 Suppl 1: 43-56.
- Schinelli S. Pharmacology and pathophysiology of the brain endothelin system: an overview. *Curr.Med.Chem.* 2006, 13: 627-638.
- Schinelli S., Zanassi P., Paolillo M., Wang H., Feliciello A., et Gallo V. Stimulation of endothelin B receptors in astrocytes induces cAMP response element-binding protein phosphorylation and c-fos expression via multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J.Neurosci.* 2001, 21: 8842-8853.
- Schinkel A. H., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C. A., et Borst P. Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin.Invest* 1995, 96: 1698-1705.
- Schmitz G. et Kaminski W. E. ABC transporters and cholesterol metabolism. *Front Biosci.* 2001, 6: D505-D514.

- Schwartz M., Solomon A., Lavie V., Ben-Bassat S., Belkin M., et Cohen A. Tumor necrosis factor facilitates regeneration of injured central nervous system axons. *Brain Res.* 1991, 545: 334-338.
- Scotto K. W. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 2003, 22: 7496-7511.
- Sedlakova R., Shivers R. R., et Del Maestro R. F. Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J Submicrosc.Cytol.Pathol* 1999, 31: 149-161.
- Seelig A. The role of size and charge for blood-brain barrier permeation of drugs and fatty acids. *J Mol Neurosci.* 2007, 33: 32-41.
- Seidel M. F., Simard J. M., Hunter S. F., et Campbell G. A. Isolation of arteriolar microvessels and culture of smooth muscle cells from cerebral cortex of guinea pig. *Cell Tissue Res.* 1991, 265: 579-587.
- Seyfried N. T., Huysentruyt L. C., Atwood J. A., III, Xia Q., Seyfried T. N., et Orlando R. Up-regulation of NG2 proteoglycan and interferon-induced transmembrane proteins 1 and 3 in mouse astrocytoma: A membrane proteomics approach. *Cancer Lett.* 2008, 263: 243-252.
- Shaftel S. S., Griffin W. S., et O'Banion M. K. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation.* 2008, 5: 7-
- Sharief M. K., Green A., Dick J. P., Gawler J., et Thompson E. J. Heightened intrathecal release of proinflammatory cytokines in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 1999, 52: 1289-1291.
- Sharom F. J., Liu R., Romsicki Y., et Lu P. Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies. *Biochim.Biophys.Acta* 1999, 1461: 327-345.
- Shaulian E. et Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001, 20: 2390-2400.
- Shibaguchi H., Himeno A., Shigematsu K., Kataoka Y., et Niwa M. Transient hypoxia/hypoglycemia upregulates endothelin B receptors in cultured rat astrocytes. *Glia* 2000, 31: 91-94.
- Shichiri M., Hirata Y., Nakajima T., Ando K., Imai T., Yanagisawa M., Masaki T., et Marumo F. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. *J Clin.Invest* 1991, 87: 1867-1871.
- Shigematsu T., Miura S., Hirokawa M., Hokari R., Higuchi H., Watanabe N., Tsuzuki Y., Kimura H., Tada S., Nakatsumi R. C., Saito H., et Ishii H. Induction of endothelin-1 synthesis by IL-2 and its modulation of rat intestinal epithelial cell growth. *Am J Physiol* 1998, 275: G556-G563.
- Shimada K., Matsushita Y., Wakabayashi K., Takahashi M., Matsubara A., Iijima Y., et Tanzawa K. Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1995, 207: 807-812.
- Shirakami G., Nakao K., Saito Y., Magaribuchi T., Mukoyama M., Arai H., Hosoda K., Suga S., Mori K., et Imura H. Low doses of endothelin-1 inhibit atrial natriuretic peptide secretion. *Endocrinology* 1993, 132: 1905-1912.
- Siebert H., Sachse A., Kuziel W. A., Maeda N., et Bruck W. The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J Neuroimmunol.* 2000, 110: 177-185.
- Simpson I. A., Carruthers A., et Vannucci S. J. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb.Blood Flow Metab* 2007, 27: 1766-1791.
- Siren A. L., Lewczuk P., Hasselblatt M., Dembowski C., Schilling L., et Ehrenreich H. Endothelin B receptor deficiency augments neuronal damage upon exposure to hypoxia-ischemia in vivo. *Brain Res.* 2002, 945: 144-149.

- Slomiany B. L., Piotrowski J., et Slomiany A. Role of endothelin-1 and interleukin-4 in buccal mucosal ulcer healing: effect of chronic alcohol ingestion. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1999, 257: 373-377.
- Slomiany B. L. et Slomiany A. Endothelin-1-dependent leptin induction in gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2005, 336: 1106-1111.
- Smit J. J., Schinkel A. H., Oude Elferink R. P., Groen A. K., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C. A., Ottenhoff R., van der Lugt N. M., van Roon M. A., et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993, 75: 451-462.
- Sobel R. A., Mitchell M. E., et Fondren G. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *Am J Pathol* 1990, 136: 1309-1316.
- Sohn E. J., Kang D. G., Choi D. H., Lee A. S., Mun Y. J., Woo W. H., Kim J. S., et Lee H. S. Effect of methanol extract of *Sorbus cortex* in a rat model of L-NAME-induced atherosclerosis. *Biol.Pharm.Bull.* 2005, 28: 1239-1243.
- Solini A., Santini E., Madec S., Cuccato S., et Ferrannini E. Effects of endothelin-1 on fibroblasts from type 2 diabetic patients: Possible role in wound healing and tissue repair. *Growth Factors* 2007, 25: 392-399.
- Song L. et Pachter J. S. Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Microvasc.Res.* 2004, 67: 78-89.
- Speciale L., Roda K., Saresella M., Taramelli D., et Ferrante P. Different endothelins stimulate cytokine production by peritoneal macrophages and microglial cell line. *Immunology* 1998, 93: 109-114.
- Speciale L., Sarasella M., Ruzzante S., Caputo D., Mancuso R., Calvo M. G., Guerini F. R., et Ferrante P. Endothelin and nitric oxide levels in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J.Neurovirol.* 2000, 6 Suppl 2: S62-S66.
- Spiegel-Kreinecker S., Buchroithner J., Elbling L., Steiner E., Wurm G., Bodenteich A., Fischer J., Micksche M., et Berger W. Expression and functional activity of the ABC-transporter proteins P-glycoprotein and multidrug-resistance protein 1 in human brain tumor cells and astrocytes. *J Neurooncol.* 2002, 57: 27-36.
- Stamatovic S. M., Shakuji P., Keep R. F., Moore B. B., Kunkel S. L., Van Rooijen N., et Andjelkovic A. V. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb.Blood Flow Metab* 2005, 25: 593-606.
- Stankova J., Orleans-Juste P., et Rola-Pleszczynski M. ET-1 induces IL-6 gene expression in human umbilical vein endothelial cells: synergistic effect of IL-1. *Am J Physiol* 1996, 271: C1073-C1078.
- Steiner J., Bernstein H. G., Bielau H., Berndt A., Brisch R., Mawrin C., Keilhoff G., et Bogerts B. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC.Neurosci.* 2007, 8: 2-
- Stewart P. A., Beliveau R., et Rogers K. A. Cellular localization of P-glycoprotein in brain versus gonadal capillaries. *J Histochem.Cytochem.* 1996, 44: 679-685.
- Stockel B., Konig J., Nies A. T., Cui Y., Brom M., et Keppler D. Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene. *Eur J Biochem.* 2000, 267: 1347-1358.
- Storch C. H., Eehalt R., Haefeli W. E., et Weiss J. Localization of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in lipid rafts/caveolae and modulation of its activity by cholesterol in vitro. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 2007, 323: 257-264.
- Strazielle N. et Ghersi-Egea J. F. Factors affecting delivery of antiviral drugs to the brain. *Rev.Med Virol.* 2005, 15: 105-133.

- Stride B. D., Valdimarsson G., Gerlach J. H., Wilson G. M., Cole S. P., et Deeley R. G. Structure and expression of the messenger RNA encoding the murine multidrug resistance protein, an ATP-binding cassette transporter. *Mol Pharmacol.* 1996, 49: 962-971.
- Strle K., Zhou J. H., Shen W. H., Broussard S. R., Johnson R. W., Freund G. G., Dantzer R., et Kelley K. W. Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev.Immunol.* 2001, 21: 427-449.
- Sugiyama T., Moriya S., Oku H., et Azuma I. Association of endothelin-1 with normal tension glaucoma: clinical and fundamental studies. *Surv.Ophthalmol.* 1995, 39 Suppl 1: S49-S56.
- Sundseth R., MacDonald G., Ting J., et King A. C. DNA elements recognizing NF-Y and Sp1 regulate the human multidrug-resistance gene promoter. *Mol Pharmacol.* 1997, 51: 963-971.
- Suzuki H., Sato S., Suzuki Y., Takekoshi K., Ishihara N., et Shimoda S. Increased endothelin concentration in CSF from patients with subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol.Scand.* 1990, 81: 553-554.
- Suzuki K., Meguro K., Sakurai T., Saitoh Y., Takeuchi S., et Nose T. Endothelin-1 concentration increases in the cerebrospinal fluid in cerebral vasospasm caused by subarachnoid hemorrhage. *Surg.Neurol.* 2000, 53: 131-135.
- Synold T. W., Dussault I., et Forman B. M. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med* 2001, 7: 584-590.
- Szelenyi J. Cytokines and the central nervous system. *Brain Res.Bull.* 2001, 54: 329-338.
- Taberner A., Stewart H. J. S., Jessen K. R., et Mirsky R. The Neuron-Glia Signal beta Neuregulin Induces Sustained CREB Phosphorylation on Ser-133 in Cultured Rat Schwann Cells. *Mol Cell Neurosci.* 1998, 10: 309-322.
- Tagami M., Nara Y., Kubota A., Fujino H., et Yamori Y. Ultrastructural changes in cerebral pericytes and astrocytes of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 1990, 21: 1064-1071.
- Takahashi K., Brooks R. A., Kanse S. M., Ghatei M. A., Kohner E. M., et Bloom S. R. Production of endothelin 1 by cultured bovine retinal endothelial cells and presence of endothelin receptors on associated pericytes. *Diabetes* 1989, 38: 1200-1202.
- Takahashi M., Matsushita Y., Iijima Y., et Tanzawa K. Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J Biol.Chem.* 1993, 268: 21394-21398.
- Talavera D., Castillo A. M., Dominguez M. C., Gutierrez A. E., et Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen.Virol.* 2004, 85: 1801-1813.
- Tanabe K., Yamamoto A., Suzuki N., Yokoyama Y., Osada N., Nakayama M., Akashi Y., Seki A., Samejima H., Oya M., Murabayashi T., Omiya K., Itoh H., Miyake F., et Murayama M. Physiological role of endothelin-1 in nonworking muscles during exercise in healthy subjects. *Jpn.Circ.J* 2000, 64: 27-31.
- Tanaka H., Moroi K., Iwai J., Takahashi H., Ohnuma N., Hori S., Takimoto M., Nishiyama M., Masaki T., Yanagisawa M., Sekiya S., et Kimura S. Novel mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease and their characterization. *J Biol.Chem.* 1998, 273: 11378-11383.
- Tang W., Yi C., Kalitsky J., et Piquette-Miller M. Endotoxin downregulates hepatic expression of P-glycoprotein and MRP2 in 2-acetylaminofluorene-treated rats. *Mol Cell Biol.Res.Commun.* 2000, 4: 90-97.
- Tansey M. G., Frank-Cannon T. C., McCoy M. K., Lee J. K., Martinez T. N., McAlpine F. E., Ruhn K. A., et Tran T. A. Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? *Front Biosci.* 2008, 13: 709-717.

- Tarkowski E., Liljeroth A. M., Minthon L., Tarkowski A., Wallin A., et Blennow K. Cerebral pattern of pro- and anti-inflammatory cytokines in dementias. *Brain Res.Bull.* 2003, 61: 255-260.
- Taub D. D., Proost P., Murphy W. J., Anver M., Longo D. L., van Damme J., et Oppenheim J. J. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin.Invest* 1995a, 95: 1370-1376.
- Taub D. D., Sayers T. J., Carter C. R., et Ortaldo J. R. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 1995b, 155: 3877-3888.
- Teng S. et Piquette-Miller M. Regulation of transporters by nuclear hormone receptors: implications during inflammation. *Mol Pharm.* 2008, 5: 67-76.
- Tesch G. H., Maifert S., Schwarting A., Rollins B. J., et Kelley V. R. Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Exp.Med* 1999, 190: 1813-1824.
- Thornberry N. A., Bull H. G., Calaycay J. R., Chapman K. T., Howard A. D., Kostura M. J., Miller D. K., Molineaux S. M., Weidner J. R., Aunins J., et . A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992, 356: 768-774.
- Tishler D. M., Weinberg K. I., Hinton D. R., Barbaro N., Annett G. M., et Raffel C. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 1995, 36: 1-6.
- Trysberg E., Blennow K., Zachrisson O., et Tarkowski A. Intrathecal levels of matrix metalloproteinases in systemic lupus erythematosus with central nervous system engagement. *Arthritis Res.Ther.* 2004, 6: R551-R556.
- Tsai C. S., Lin F. Y., Chen Y. H., Yang T. L., Wang H. J., Huang G. S., Lin C. Y., Tsai Y. T., Lin S. J., et Li C. Y. Cilostazol attenuates MCP-1 and MMP-9 expression in vivo in LPS-administrated balloon-injured rabbit aorta and in vitro in LPS-treated monocytic THP-1 cells. *J Cell Biochem.* 2008, 103: 54-66.
- Tsutsumi K., Niwa M., Kitagawa N., Yamaga S., Anda T., Himeno A., Sato T., Khalid H., Taniyama K., et Shibata S. Enhanced expression of an endothelin ETA receptor in capillaries from human glioblastoma: a quantitative receptor autoradiographic analysis using a radioluminographic imaging plate system. *J Neurochem.* 1994, 63: 2240-2247.
- Tzourio C., El Amrani M., Poirier O., Nicaud V., Bousser M. G., et Alperovitch A. Association between migraine and endothelin type A receptor (ETA -231 A/G) gene polymorphism. *Neurology* 2001, 56: 1273-1277.
- Uhr M., Ebinger M., Rosenhagen M. C., et Grauer M. T. The anti-Parkinson drug bupropion is exported actively out of the brain by P-glycoprotein in mice. *Neurosci.Lett.* 2005, 383: 73-76.
- Uhr M., Grauer M. T., et Holsboer F. Differential enhancement of antidepressant penetration into the brain in mice with abcb1ab (mdr1ab) P-glycoprotein gene disruption. *Biol.Psychiatry* 2003, 54: 840-846.
- Uhr M., Steckler T., Yassouridis A., et Holsboer F. Penetration of amitriptyline, but not of fluoxetine, into brain is enhanced in mice with blood-brain barrier deficiency due to mdr1a P-glycoprotein gene disruption. *Neuropsychopharmacology* 2000, 22: 380-387.
- van den Buuse M. et Webber K. M. Endothelin and dopamine release. *Prog.Neurobiol.* 2000, 60: 385-405.
- van Herwaarden A. E. et Schinkel A. H. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol.Sci* 2006, 27: 10-16.
- van Damme J., Proost P., Lenaerts J. P., et Opendakker G. Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp.Med* 1992, 176: 59-65.

- Verma S., Li S. H., Wang C. H., Fedak P. W., Li R. K., Weisel R. D., et Mickle D. A. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003, 108: 736-740.
- Vilaboa N. E., Galan A., Troyano A., de Blas E., et Aller P. Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1). *J Biol.Chem.* 2000, 275: 24970-24976.
- Volterra A. et Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev.Neurosci.* 2005, 6: 626-640.
- von Andrian U. H., Chambers J. D., McEvoy L. M., Bargatze R. F., Arfors K. E., et Butcher E. C. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88: 7538-7542.
- Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J., et Gay N. J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982, 1: 945-951.
- Walz W. Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia* 2000, 31: 95-103.
- Wang H., Long C., Duan Z., Shi C., Jia G., et Zhang Y. A new ATP-sensitive potassium channel opener protects endothelial function in cultured aortic endothelial cells. *Cardiovasc.Res.* 2007, 73: 497-503.
- Wang L., Li Y., Chen X., Chen J., Gautam S. C., Xu Y., et Chopp M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology* 2002, 7: 113-117.
- Watkins L. R., Maier S. F., et Goehler L. E. Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci* 1995, 57: 1011-1026.
- Webber K. M., Pennefather J. N., Head G. A., et van den Buuse M. Endothelin induces dopamine release from rat striatum via endothelin-B receptors. *Neuroscience* 1998, 86: 1173-1180.
- Whitton P. S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br.J Pharmacol.* 2007, 150: 963-976.
- Wilkins P. L., Suchovsky D., et Berti-Mattera L. N. Immortalized schwann cells express endothelin receptors coupled to adenylyl cyclase and phospholipase C. *Neurochem.Res.* 1997, 22: 409-418.
- Wolburg H., Neuhaus J., Kniesel U., Krauss B., Schmid E. M., Ocalan M., Farrell C., et Risau W. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 1994, 107 (Pt 5): 1347-1357.
- Wolburg H., Wolburg-Buchholz K., Kraus J., Rascher-Eggstein G., Liebner S., Hamm S., Duffner F., Grote E. H., Risau W., et Engelhardt B. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 2003, 105: 586-592.
- Wong D., Prameya R., et Dorovini-Zis K. Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differentially regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability. *J Neuroimmunol.* 2007, 184: 136-148.
- Woollett L. A. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. *Am J Clin.Nutr.* 2005, 82: 1155-1161.
- Wright C. E. et Fozard J. R. Regional vasodilation is a prominent feature of the haemodynamic response to endothelin in anaesthetized, spontaneously hypertensive rats. *Eur.J.Pharmacol.* 1988, 155: 201-203.

- Wu C. Y., Kaur C., Lu J., Cao Q., Guo C. H., Zhou Y., Sivakumar V., et Ling E. A. Transient expression of endothelins in the amoeboid microglial cells in the developing rat brain. *Glia* 2006, 54: 513-525.
- Wyss-Coray T. et Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 2002, 35: 419-432.
- Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001, 12: 375-391.
- Xu D., Emoto N., Giaid A., Slaughter C., Kaw S., deWit D., et Yanagisawa M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994, 78: 473-485.
- Xu J., Liu Y., Yang Y., Bates S., et Zhang J. T. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol. Chem.* 2004, 279: 19781-19789.
- Yagami T., Ueda K., Asakura K., Kuroda T., Hata S., Sakaeda T., Kambayashi Y., et Fujimoto M. Effects of endothelin B receptor agonists on amyloid beta protein (25-35)-induced neuronal cell death. *Brain Res.* 2002, 948: 72-81.
- Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., et Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988, 332: 411-415.
- Yang Z., Li C. S., Shen D. D., et Ho R. J. Cloning and characterization of the rat multidrug resistance-associated protein 1. *AAPS.PharmSci.* 2002, 4: E15-
- Yao J., Morioka T., Li B., et Oite T. Endothelin is a potent inhibitor of matrix metalloproteinase-2 secretion and activation in rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001, 280: F628-F635.
- Yasuda M., Kohno M., Tahara A., Itagane H., Toda I., Akioka K., Teragaki M., Oku H., Takeuchi K., et Takeda T. Circulating immunoreactive endothelin in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1990, 119: 801-806.
- Ye Z. C. et Sontheimer H. Cytokine modulation of glial glutamate uptake: a possible involvement of nitric oxide. *Neuroreport* 1996, 7: 2181-2185.
- Yoo S. et Wrathall J. R. Mixed primary culture and clonal analysis provide evidence that NG2 proteoglycan-expressing cells after spinal cord injury are glial progenitors. *Dev.Neurobiol.* 2007, 67: 860-874.
- Yoshimoto S., Ishizaki Y., Kurihara H., Sasaki T., Yoshizumi M., Yanagisawa M., Yazaki Y., Masaki T., Takakura K., et Murota S. Cerebral microvessel endothelium is producing endothelin. *Brain Res.* 1990, 508: 283-285.
- Yoshimura T., Robinson E. A., Tanaka S., Appella E., Kuratsu J., et Leonard E. J. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp.Med* 1989a, 169: 1449-1459.
- Yoshimura T., Robinson E. A., Tanaka S., Appella E., et Leonard E. J. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J Immunol.* 1989b, 142: 1956-1962.
- Yoshizawa T., Iwamoto H., Mizusawa H., Suzuki N., Matsumoto H., et Kanazawa I. Cerebrospinal fluid endothelin-1 in Alzheimer's disease and senile dementia of Alzheimer type. *Neuropeptides* 1992, 22: 85-88.
- Yoshizawa T., Kimura S., Kanazawa I., Uchiyama Y., Yanagisawa M., et Masaki T. Endothelin localizes in the dorsal horn and acts on the spinal neurones: possible involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels and substance P release. *Neurosci.Lett.* 1989, 102: 179-184.
- Yoshizumi M., Kurihara H., Morita T., Yamashita T., Oh-hashii Y., Sugiyama T., Takaku F., Yanagisawa M., Masaki T., et Yazaki Y. Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1990, 166: 324-329.

- Yu C., Kastin A. J., Tu H., Waters S., et Pan W. TNF activates P-glycoprotein in cerebral microvascular endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*. 2007, 20: 853-858.
- Zhang P., Tian X., Chandra P., et Brouwer K. L. Role of glycosylation in trafficking of Mrp2 in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Mol Pharmacol*. 2005, 67: 1334-1341.
- Zhang R. L., Chopp M., Chen H., et Garcia J. H. Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol.Sci* 1994a, 125: 3-10.
- Zhang W. W., Badonic T., Hoog A., Jiang M. H., Ma K. C., Nie X. J., et Olsson Y. Astrocytes in Alzheimer's disease express immunoreactivity to the vaso-constrictor endothelin-1. *J.Neurol.Sci*. 1994b, 122: 90-96.
- Zhang Y. et Rollins B. J. A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimer. *Mol Cell Biol*. 1995, 15: 4851-4855.
- Zhang Y., Schuetz J. D., Elmquist W. F., et Miller D. W. Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells. *J Pharmacol.Exp.Ther*. 2004a, 311: 449-455.
- Zhang Z., Wu J. Y., Hait W. N., et Yang J. M. Regulation of the stability of P-glycoprotein by ubiquitination. *Mol Pharmacol*. 2004b, 66: 395-403.
- Zhao M. L., Kim M. O., Morgello S., et Lee S. C. Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. *J Neuroimmunol*. 2001, 115: 182-191.
- Zhu Q. et Center M. S. Evidence that SP1 modulates transcriptional activity of the multidrug resistance-associated protein gene. *DNA Cell Biol*. 1996, 15: 105-111.
- Zidovetzki R., Chen P., Chen M., et Hofman F. M. Endothelin-1-induced interleukin-8 production in human brain-derived endothelial cells is mediated by the protein kinase C and protein tyrosine kinase pathways. *Blood* 1999, 94: 1291-1299.
- Zlokovic B. V. et Apuzzo M. L. Strategies to circumvent vascular barriers of the central nervous system. *Neurosurgery* 1998, 43: 877-878.
- Zlotnik A. et Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000, 12: 121-127.
- Zouki C., Baron C., Fournier A., et Filep J. G. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET(A) receptors and platelet-activating factor. *Br.J Pharmacol*. 1999, 127: 969-979.