Dossier

Modèles *in vitro* humains de barrière hémato-encéphalique : exemple de l'épilepsie

CORALY SIMOËS DA GAMA, AMBRE POUVREAU & MELANIE MORIN-BRUREAU

Sorbonne Université, Inserm U938, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, Système immunitaire et neuroinflammation, Hôpital Saint-Antoine, F-75012, Paris, France.

Introduction

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière à la fois physique et métabolique séparant la circulation sanguine du système nerveux central (SNC). Celle-ci permet le maintien de l'homéostasie cérébrale en permettant l'entrée des nutriments essentiels au bon fonctionnement cérébral et en éliminant des déchets grâce à de nombreux transporteurs présents sur les cellules. Les cellules endothéliales constituent le siège anatomique de cette BHE dont la présence de protéines de jonctions entre elles lui confère cette capacité d'être imperméable. Mais ces cellules à elles seules ne sont pas suffisantes et sont donc soutenues par la membrane basale et de nombreuses autres cellules essentielles telles que les péricytes et les astrocytes. Cette imperméabilité rend le traitement pharmacologique des maladies neurologiques complexe. Il est donc souvent recherché les moyens de la traverser mais ces études sont entravées par sa complexité et la difficulté à la modéliser. Les premières études se sont faites sur des modèles murins, qui avaient pour avantage de garder l'architecture complète de la BHE ainsi que le flux sanguin. L'utilisation de ces modèles présente aussi de nombreux inconvénients comme un coût élevé, des expériences longues dans le cas du vieillissement, des problèmes éthiques mais surtout des différences moléculaires et transcriptomiques entre les animaux et l'homme. Tout ceci a donc poussé le développement de modèles *in vitro* humains de la BHE qui offrent la possibilité d'un contrôle facile et reproductible de l'environnement cellulaire, une accessibilité améliorée pour une analyse mécanistique, une réduction des préoccupations éthiques, et la possibilité de développer une médecine personnalisée. De plus les modèles cellulaires humains facilitent l'étude sur la dégradation de la BHE due à des facteurs extrinsèques, tels qu'une infection virale, un traumatisme cérébral, ou en conséquence de maladies telles que le diabète et l'hypertension.

L'analyse comparative des avantages et inconvénients des études *in vivo* et *in vitro* de la BHE souligne l'absence d'un modèle parfait. Le choix du modèle approprié dépend des questions scientifiques posées. Cette revue explore l'évolution des modèles *in vitro* de la BHE. Puis un exemple sera donné avec l'utilisation de ces modèles dans l'épilepsie.

Les modèles *in vitro* de BHE humaine

Les premiers modèles *in vitro* de la BHE, émergeant dans les années 1980, utilisaient des monocouches de cellules endothéliales de rongeurs, mais un modèle basé sur les cellules endothéliales du cerveau humain (hBEC) a été introduit en 1985. Ces modèles ont depuis évolué pour intégrer des dimensions physiologiques, une géométrie réaliste et des flux sanguins simulés au-delà des cellules endothéliales (Fig.1A) (1).

L'objectif premier était d'améliorer la perméabilité de ces modèles, il a pour cela été développé le système de Transwell qui consiste à cultiver une monocouche de cellules hBEC sur des membranes semi-perméables. Ceci crée donc une compartimentation permettant l'étude de flux de traceurs fluorescents mais aussi de cellules immunitaires. Mais ce modèle ne reflétait pas la complexité de la BHE en raison notamment de l'absence des astrocytes et des péricytes, essentiels au maintien et au développement des propriétés de la BHE. Ce problème fut résolu par la réalisation de co-cultures avec tous les types cellulaires. Par convention, la partie supérieure représente le compartiment vasculaire avec les cellules endothéliales au contact de la membrane et sur la partie inférieure sont cultivés les péricytes et les

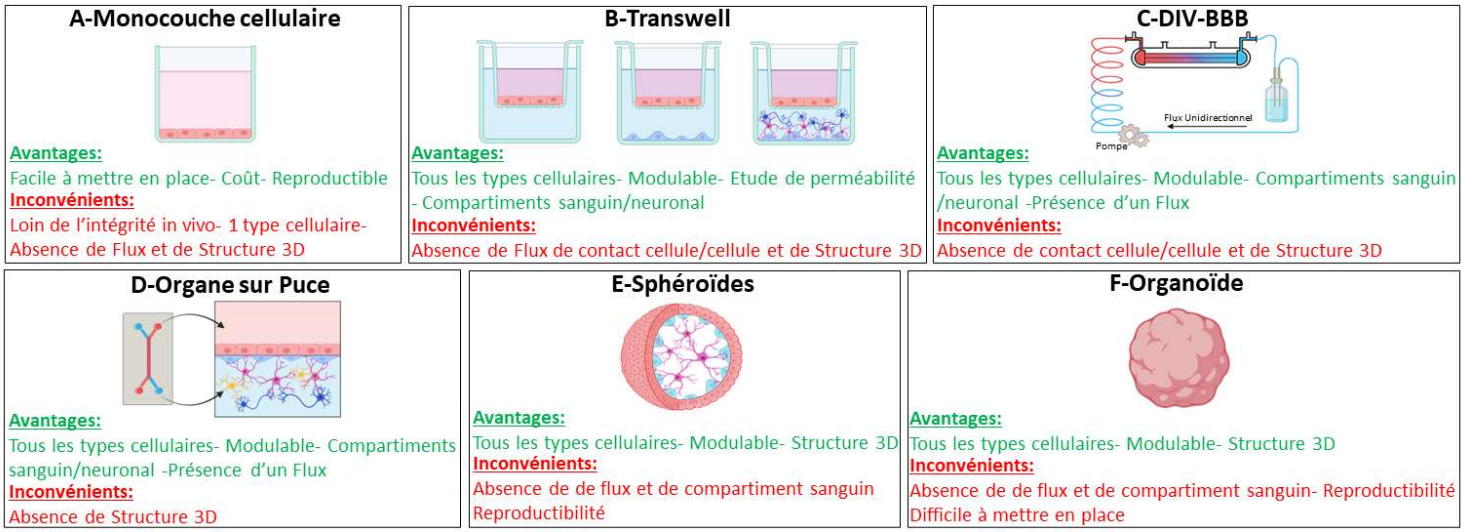

Figure 1: Les différents modèles humains in vitro de BHE
Les modèles in vitro de BHE se sont complexifiés au cours du temps passant de simple monocouche (A) à des modèles de co-culture 2D (B). Pour recréer les effets du flux sanguin le modèle DIV-BBB (C) et organe sur puce (D) dans lequel les contacts cellulaires sont présents. La structure 3D de la BHE est retrouvée dans les modèles de sphéroïdes (E) et organoïde (F).

astrocytes. Puis, les neurones dont l'impact sur les propriétés de la BHE a été montré, ont été introduits. Ce modèle permet de faire des études moléculaires par des techniques d'immunohistochimie, de protéomique et de génomique sur des cellules détachées des membranes. La culture sur Transwell a donc pour avantages d'être facile à configurer, reproductible et évolutive. Cependant, il manque des aspects essentiels dans la modélisation de la BHE tels que le contact cellule-cellule en 3D, le flux sanguin et la contrainte de cisaillement en découlant, impactant les propriétés des cellules endothéliales (Fig.1B).

Il a donc été créé artificiellement des capillaires en fibres de polycarbonate pré-enduites de fibronectine, de collagène de rat ou de poly-D-lysine qui permettaient d'allier structure 3D et flux. Ces modèles dynamiques de BHE in vitro (DIV-BBB) présentent du côté intra-laminal les cellules endothéliales, et du côté extra-laminal les péricytes et astrocytes avec un flux généré par une pompe reproduisant un flux pulsatile. Cette modélisation a permis d'améliorer de nombreux paramètres avec des valeurs de résistance électrique transépithéliale / transendothéliale (TEER), reflet de l'imperméabilité, à des niveaux similaires à ceux retrouvés *in vivo*. Des ajustements ultérieurs ont été apportés, par l'utilisation de fibres séparées pour les capillaires et les veinules ainsi que le remplacement des astrocytes par des cellules musculaires lisses humaines (Fig.1C).

Malgré le progrès qu'a pu apporter le modèle DIV-BBB, il fut rapidement remplacé par des modèles de puces basés sur des techniques de nano-fabrication et microfluidiques. Des évolutions ont vu le jour au sein même du modèle avec une complexification par l'ajout au fur et à mesure des différents types cellulaires passant de la monocouche de cellules endothéliales seule (BBB-on-chip) a des co-cultures avec des péricytes et astrocytes (NVU-on-chip) . Différents matériaux de puces, biologiques (collagène), synthétique (le PDMS (Poly-DI-Methyl-Siloxane)) et des matériaux hybrides, ont été utilisés pour créer des canaux microfluidiques biocompatibles, prenant en compte la biocompatibilité des composants naturels et les propriétés physicochimiques des composants synthétiques. Malgré des avancées comme le SyM-BBB (Synthetic Microvasculature model of the Blood-Brain Barrier) avec des structures trapézoïdales, des tentatives de reproduction de vaisseaux sanguins circulaires avec une imprimante 3D, et des modèles de puce utilisant la vasculogenèse, ces modèles prometteurs nécessitent encore des travaux supplémentaires pour améliorer la reproductibilité du modèle (Fig.1D-E).

Les modèles organoïdes de la BHE ont évolué simultanément. Ils sont composés d'agrégats de cellules sphéroïdes *in vitro*, présentant souvent une similitude significative avec la structure 3D *in vivo* . Les premiers organoïdes de la BHE étaient constitués de cellules endothéliales humaines, d'astrocytes et de péricytes s'auto-assemblant dans des conditions de faible adhérence. Bien que dépourvus de microglies et de neurones, qui jouent également un rôle dans la formation et le maintien de la BHE, ces organoïdes renforcent leur pertinence en permettant un contact direct entre ces trois types cellulaires. Des tentatives ont été faites pour générer des organoïdes cérébraux humains vascularisés en revêtant des organoïdes avec des cellules endothéliales dérivées de cellules souches induites (iPSC) du même individu. De plus, des modèles BHE 3D récents

ont intégré six types de cellules corticales, démontrant des réponses fonctionnelles à l'hypoxie et à la neurotoxicité. Bien que des tests et une validation plus approfondie soient nécessaires, ces modèles organoïdes BHE semblent prometteurs pour la recherche sur les neuropathologies (Fig.1F).

A côté de tout ceci, les cultures organotypiques de tissus cérébraux sont également employées pour examiner l'activité neuronale et les interactions cellulaires, bénéficiant de l'avantage de préserver les relations spatiales entre les différents types de cellules. La découverte dans ces cultures du rôle des vaisseaux sanguins répondant aux stimuli angiogéniques, a conduit à leur adoption en tant que modèles de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les cellules endothéliales capillaires expriment des protéines de jonction serrée ainsi que des molécules de transport, notamment la P-gp (glycoprotéine P) et GLUT1 (transporteur du glucose de type 1). Des co-cultures de tissus cérébraux organotypiques superposées à des cellules endothéliales ont facilité des expériences de microdialyse et des mesures de la TEER. Bien que la majorité de la recherche sur les cultures organotypiques ait été réalisée sur des tissus de rongeurs, l'utilisation de cultures organotypiques de tissus humains, obtenues après des interventions chirurgicales sur des patients épileptiques, s'est avérée utile pour étudier l'activité neuronale et les crises d'épilepsie, ouvrant la voie à des investigations sur le rôle de la BHE.

Altération de la BHE dans l'épilepsie et utilisation des modèles *in vitro*

L'épilepsie est une maladie chronique caractérisée par des crises récurrentes et spontanées en conséquence d'une hyperexcitabilité neuronale. L'altération de la BHE est établie à la fois comme une conséquence de ces crises mais est reconnue comme participant à l'épileptogènese suite à l'entrée de protéines sanguines en conséquence d'une perméabilité accrue de la BHE mais aussi une augmentation de la pharmacorésistance des patients en conséquence d'une augmentation du nombre des pompes à efflux (Fig.2). Une boucle s'installe alors, dans laquelle crises et rupture de la BHE se renforcent continuellement. Comprendre l'altération de la BHE est alors important pour couper ce cercle de renforcement.

Les études concernant la perméabilité vasculaire dans l'épilepsie ont démontré une forte dérégulation de la barrière cellulaire. Concernant les péricytes, il a été noté une diminution de leur nombre à la suite d'une crise d'épilepsie, associée à leur détachement de la membrane basale et à un réarrangement spatial incluant une interaction microglies-péricytes proche des vaisseaux. Une diminution de la réactivité vasculaire par perte du couplage neurovasculaire a été associée à une dépolarisation mitochondriale dans les péricytes. Quant aux astrocytes, ils ont été très peu étudiés dans le cadre de la perméabilité de la BHE. On note cependant, que

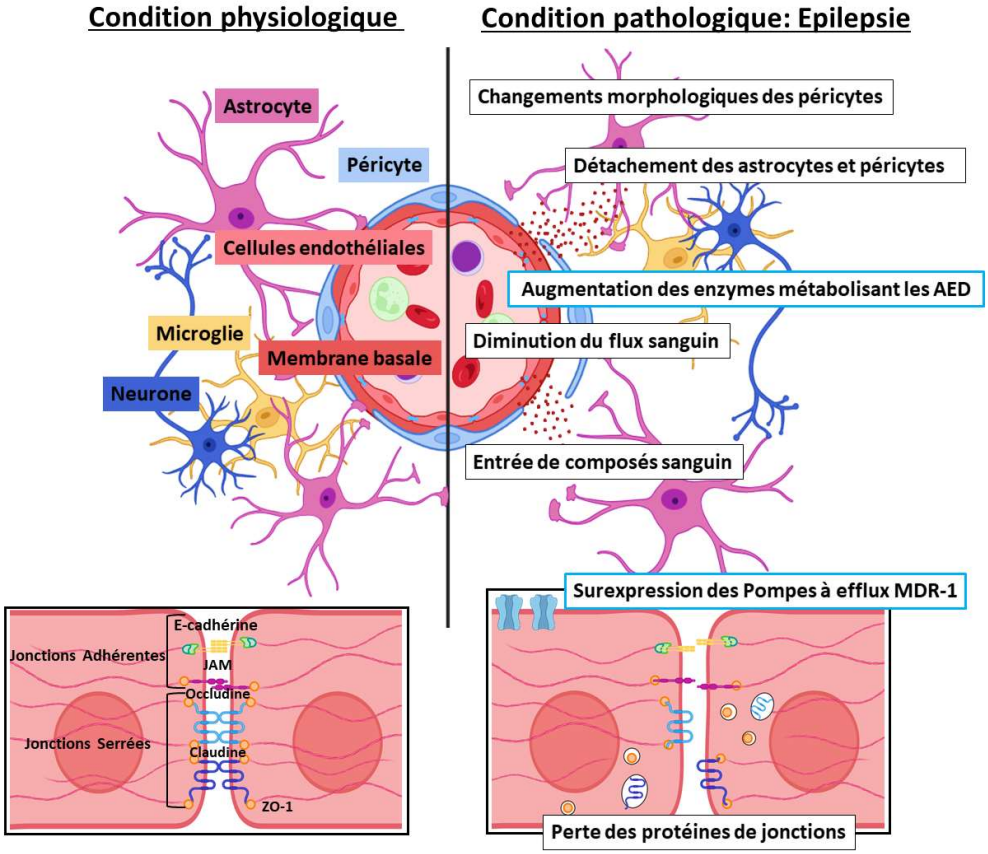

Figure 2: Représentation de la Barrière hémato-encéphalique en condition physiologique et pathologiques
En condition physiologique, les cellules endothéliales sont associées aux péricytes et aux astrocytes formant la barrière cellulaire de la BHE. Les cellules endothéliales sont connectées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes qui assurent l'imperméabilité et forme la barrière physique. En condition pathologique, la structure de la BHE est affectée conduisant notamment à un détachement des péricytes et des astrocytes et une perte des jonctions serrées conduisant à une diminution du flux sanguine et à l'infiltration de molécules toxiques dans le parenchyme.

suite à une crise, une astrogliose réactive a lieu au niveau de la BHE, en réponse à l'activation des cellules microgliales, et se traduit par des astrocytes « activés », avec une morphologie allongée, pouvant aboutir à la formation de cicatrices gliales, et à une altération des processus permettant le maintien de l'homéostasie par une perte des jonctions GAP. Les cellules endothéliales, montrent une perte de la protéine jonctionnelle ZO-1, suite à la sécrétion du facteur de croissance vasculaire (VEGF) par les neurones et astrocytes, induisant une activation de la tyrosine kinase src suite à l'activation de VEGFR2 De plus, il a été noté une augmentation de l'expression des Métalloprotéases Matricielles (MMPs) au niveau de la barrière, notamment des MMP-2 et MMP-9, qui cause la dégradation de la membrane basale et des protéines jonctionnelles comme la claudine ou l'occludine (2). Toutes ces études ont été réalisées sur des modèles rongeurs d'épilepsie *in vivo* ou *ex vivo*. Très peu d'études utilisent les modèles humains pour comprendre les mécanismes de perméabilité. On note l'utilisation de culture simple de lignées cellulaires de péricytes humains, d'astrocytes ou de cellules endothéliales dans le but d'étudier les réponses cellulaires morphologiques ou sécrétoires suite à des traitements inflammatoires (3) ou d'inhibiteurs de MMPs (4).

La pharmacorésistance aux anti-épileptiques (AEDs) est elle aussi associée à des changements au niveau de la barrière cellulaire. On retrouve notamment une augmentation des enzymes capables de métaboliser les AEDs ; une affinité de certains AEDs avec les protéines sériques diminuant ainsi leur distribution notamment dans les zones de haute imperméabilité de la BHE et enfin une surexpression des pompes à efflux chez les patients, notamment dans les zones de rupture de la BHE (5). Des modèles simples de monocouche de cellules endothéliales humaines ont été utilisés pour identifier les transporteurs des AEDs (6), les mécanismes de surexpression (7) ou encore les différences entre patients répondeurs ou non aux AEDs (8). Ces monocouches de cellules humaines endothéliales ont permis d'étudier la capacité de certaines nanoparticules recouvertes de l'AED (par exemple le valproate) à traverser les cellules endothéliales (9). Concernant la barrière métabolique, le modèle *in vitro* dynamique (DIV) a permis d'observer que l'expression des enzymes métaboliques de la famille des CYP par les cellules endothéliales dépend des paramètres hémodynamiques, que l'on connaît perturbés chez les patients épileptiques (10).

Dans de nombreuses maladies neurologiques, les altérations de la BHE sont étroitement liées à des changements dans le microenvironnement neuronal. Les interactions complexes entre les neurones et les cellules endothéliales vasculaires jouent un rôle central dans le maintien de l'intégrité de la BHE. Et bien que plusieurs modèles *in vitro* de la BHE existent, peu d'entre eux intègrent de manière adéquate les composantes neuronales et vasculaires. Notre revue met en évidence les récents développements dans la création de modèles plus complets, intégrant des cellules neuronales et endothéliales dans une architecture simple tridimensionnelle. Ces avancées permettent une meilleure représentation des interactions dynamiques entre les neurones et les cellules endothéliales, offrant ainsi une modélisation plus réaliste pour étudier les altérations de la BHE. Ces modèles améliorés pourraient également servir de plateformes de criblage pour le développement de thérapies ciblées visant à restaurer l'intégrité de la BHE dans des contextes pathologiques spécifiques.

melanie.morin-brureau@sorbonne-universite.fr
ambrepouvreau@gmail.com
coraly.simoes-da-gama@inserm.fr

Références

(1) Coraly Simoes Da Gama et al. (2022). Front Cell Neurosci e-collection.

(2) Reiss Y et al. (2023) Brain Pathol 33(2):e13147.

(3) Klement W et al. (2018) Neurobiol Dis113:70-81.

(4) Diede W M et al. (2022) Biomedecines 29;10(9):2117.

(5) Van Vliet EA et al. (2014) Neuroscience 26:277:455-73.

(6) David D et al. (2013) Biochem Pharmacol 85(11):1672-83.

(7) Kukal S et al. (2023) Mol Pharmacol 103(3):145-157.

(8) Rawat C et al. (2020) Sci Rep 13;10(1):2546.

(9) Lopalco A et al (2015). Int J Nanomedicine 11:10:1985-96.

(10) Gosch C et al (2010) Epilepsia, 51(8):1408-17.