

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Faculté de Pharmacie de Paris

Ecole Doctorale n°563 : **MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIE et IMAGERIE**

Unité Inserm UMR-S 1144 : Variabilité de Réponse aux Psychotropes

Equipe de recherche : Physiopathologie et cibles thérapeutiques de la Barrière Hémato-Encéphalique

THESE DE DOCTORAT

soutenue le 16/03/2018

par **Camille TACCOLA**

Evaluation de l'intégrité physique et fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique dans un modèle murin de neurodégénérescence ; impact pharmacocinétique sur un exemple de candidat médicament

Thèse réalisée en collaboration avec le **laboratoire SANOFI**

Composition du jury :

Directeurs de thèse : Dr Fanchon Bourasset
Pr Xavier Declèves

Rapporteurs : Pr Laurence Tilloy-Fenart
Dr Jérôme Badaut

Examineurs : Pr Sandrine Marchand
Pr Claire Paquet
Dr Sylvaine Cartot-Cotton



UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Faculté de Pharmacie de Paris

Ecole Doctorale n°563 : **MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIE et IMAGERIE**

Unité Inserm UMR-S 1144 : Variabilité de Réponse aux Psychotropes

Equipe de recherche : Physiopathologie et cibles thérapeutiques de la Barrière Hémato-Encéphalique

THESE DE DOCTORAT

soutenue le 16/03/2018

par Camille TACCOLA

Evaluation de l'intégrité physique et fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique dans un modèle murin de neurodégénérescence ; impact pharmacocinétique sur un exemple de candidat médicament

Thèse réalisée en collaboration avec le **laboratoire SANOFI**

Composition du jury :

Directeurs de thèse : Dr Fanchon Bourasset
Pr Xavier Declèves

Rapporteurs : Pr Laurence Tilloy-Fenart
Dr Jérôme Badaut

Examineurs : Pr Sandrine Marchand
Pr Claire Paquet
Dr Sylvaine Cartot-Cotton



Je remercie sincèrement,

Madame le Docteur Fanchon Bourasset pour avoir accepté de diriger et d'encadrer cette thèse. Merci beaucoup pour m'avoir accompagnée pendant ce projet et m'avoir permis de mener à bien ce travail de thèse. Je te remercie tout particulièrement pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton optimisme en toute situation !

Monsieur le Professeur Xavier Declèves pour avoir accepté de diriger cette thèse et m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche pour y réaliser mon travail de thèse. Merci pour m'avoir guidée et conseillée tout au long de ces trois années.

Madame le Docteur Sylvaine Cartot-Cotton pour m'avoir encadrée pendant cette thèse et pour me faire le plaisir de siéger dans ce jury de thèse en qualité d'examineur. Un grand merci pour le suivi tout au long de ces trois années et pour le temps et les efforts investis pour rendre ce projet possible.

Madame le Professeur Laurence Tilloy-Fenart et Monsieur le Docteur Jérôme Badaut pour me faire l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie pour le temps consacré à la lecture et à l'évaluation de mon travail.

Madame le Professeur Sandrine Marchand et Madame le Professeur Claire Paquet pour me faire le plaisir de siéger dans ce jury de thèse en qualité d'examineurs. Je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à mon travail.

Madame le Docteur Delphine Valente pour m'avoir accueillie au sein du département *Drug Metabolism & Pharmacokinetics* du laboratoire Sanofi et pour avoir contribué à la mise en place et au suivi de ce projet.

Je remercie chaleureusement tous les collaborateurs du laboratoire Sanofi ayant participé à ce projet, en particulier Christine Mauriac, Sébastien Roy, Pascale Vicat, Olivier Pasquier, Valérie Boutet, Catherine Aubert, Jean-Baptiste Fau, Florent Mazuir, Laurent Nguyen, Pascal Cochet, Fabienne Gallen et Philippe Rateau. Merci pour votre participation scientifique et technique.

Monsieur le Docteur Pascal Barneoud pour les discussions scientifiques et les relectures tout au long de ce travail de thèse. Un grand merci à toute l'équipe *Neuroscience Therapeutic Area*, et tout particulièrement à Delphine Ibghi, Véronique Taupin, Patrick Bernardelli, Mati Lopez, Valérie Fleury, Carine Vincent et Nathalie Schussler. Un grand merci pour votre collaboration.

Monsieur le Professeur Jean-Louis Laplanche pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité Inserm UMR-S 1144, « Variabilité de réponse aux psychotropes ». Ce fut un plaisir de passer ces trois années dans votre unité !

Je souhaite remercier chaleureusement l'ensemble de l'unité Inserm UMR-S 1144, et tout particulièrement Salvatore Cisternino, Bruno Saubaméa, Stéphanie Chasseigneaux, Véronique Cochois, Virginie Mignon, Lucie Chevillard et Emmanuel Curis pour votre temps, vos conseils et votre aide précieuse.

Merci à Ariane Tersac pour ta disponibilité et ta gentillesse.

Je remercie également Maria Smirnova, Sophie Nicolic et Murielle Lochus pour votre soutien et votre bonne humeur dans le labo de radiopharmacie !

Un grand merci à Agnès Dodacki pour m'avoir initiée à la perfusion cérébrale *in situ* !

Merci à Madame Iharilalao Dubail pour avoir accueilli mes souris dans les meilleures conditions possibles.

Merci à mes collègues doctorants et co-doctorants de l'unité 1144 et d'ailleurs ! Merci à Agnès, David, Jev, Anne-sophie, Camille, Ola, Betty, Catarina, Marine, Olivia et Long pour les bons moments passés et pour votre soutien.

Merci à tous mes collègues du Laboratoire Sanofi. Un grand merci à Cécile Ducelier pour avoir partagé son bureau avec moi et Floris Fauchet pour les pauses baby-foot ! Je vous remercie pour votre amitié et pour les encouragements.

Merci à Céline, Magalie et Daniel pour avoir été là pour moi durant ces trois années !

Je dédie cette thèse à mes parents. Merci de m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mes études.

Table des matières

Liste des abréviations	8
Liste des figures	14
Liste des tableaux	15
INTRODUCTION GENERALE	16
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	18
I) Les maladies neurodégénératives	18
A. Généralités	18
A.1. Définition, épidémiologie et enjeux	18
A.2. Points communs des maladies neurodégénératives et mécanismes cellulaires	20
B. La maladie d'Alzheimer	33
B.1. Définition, généralités et données épidémiologiques	33
B.2. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	34
B.3. Les facteurs de risque	47
B.4. Approches thérapeutiques	55
C. Les modèles murins utilisés dans la maladie d'Alzheimer	61
C.1. Intérêt des modèles murins	61
C.2. Modèles non transgéniques	62
C.3. Modèles transgéniques de maladie d'Alzheimer	63
C.4. Bilan des modèles murins transgéniques utilisés dans la maladie d'Alzheimer	73
II) La barrière hémato-encéphalique	76
A. Généralités	76
A.1. Les barrières du cerveau	76
A.2. Vascularisation du cerveau	77
A.3. Mise en évidence de l'existence d'une barrière	79
B. Structure et fonctions de la barrière	80
B.1. Notion d'unité neuro-vasculaire	80
B.2. Mécanismes de transport au travers de la barrière	86

C.	Modifications de l'unité neuro-vasculaire dans la maladie d'Alzheimer	100
C.1.	Dysfonctions vasculaires.....	101
C.2.	Modifications de l'intégrité physique de la barrière hémato-encéphalique	105
C.3.	Modifications de l'intégrité fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique.....	110
C.4.	L'hypothèse neurovasculaire de la maladie d'Alzheimer	114
C.5.	Bilan des modifications de l'unité neuro-vasculaire dans la maladie d'Alzheimer	117
	Hypotheses et objectifs	120
	Matériel et méthodes.....	122
I)	Animaux.....	122
A.	Souris <i>Abcb1a</i> ^{-/-} / <i>Abcb1b</i> ^{-/-} / <i>Abcg2</i> ^{-/-}	122
B.	Souris p25	123
II)	La technique de perfusion cérébrale <i>in situ</i>	123
A.	Procédure chirurgicale et technique de perfusion chez la souris	124
B.	Fluide de perfusion.....	124
C.	Calcul des paramètres de transport au travers de la barrière hémato-encéphalique.....	125
	TRAVAUX PERSONNELS	128
	1 ^{ère} partie: Caractérisation de l'intégrité physique et fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique dans un contexte de neurodégénérescence	130
	Article 1: Modifications of physical and functional integrity of the blood-brain barrier in an inducible mouse model of neurodegeneration.....	134
	2 ^{ème} partie: Etude de l'impact des modifications fonctionnelles de la barrière hémato-encéphalique sur le passage d'un candidat médicament à visée cérébrale dans un contexte de neurodégénérescence	178
	Article 2: High brain distribution of a new central nervous system drug candidate despite its P-glycoprotein-mediated efflux at the mouse blood-brain barrier.....	182
	Article 3: Modifications of the functional integrity of the blood-brain barrier of p25 mice, an inducible mouse model of severe neurodegeneration, and consequences on the brain uptake of a CNS disorders drug candidate.	200
	DISCUSSION GENERALE	240
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	260
	REFERENCES	264

Liste des abréviations

24S-OH-chol: 24S-hydroxy-cholestérol

27-OH-chol: 27-hydroxy-cholestérol

A-C

A2M: *alpha-2-macroglobulin*, alpha-2-macroglobuline

A β : *amyloid beta*, peptide bêta amyloïde

ABC: *ATP-binding cassette*

ACAT: *acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase*, acyl-coenzyme A cholestérol acyltransférase

AChEI: *acetylcholinesterase inhibitor*, inhibiteurs d'acétylcholinestérase

AChR: *acetylcholine receptor*, récepteur à l'acétylcholine

ADAMs: *A disintegrin and metalloproteases*

ADP: *adenosine diphosphate*, adénosine diphosphate

AGEs: *advanced glycation endproducts*, produits de glycation avancée

AICD: *APP intracellular domain*, domaine intracellulaire de l'APP

AINS: anti-inflammatoire non stéroïdien

AMT: *adsorptive-mediated transcytosis*, transcytose médiée par adsorption

ANG1: *angiopoietin 1*, angiopoïétine 1

APH1: *anterior pharynx-defective 1*

ApoE: *apolipoprotein E*, apolipoprotéine E

APP: *amyloid precursor protein*, protéine précurseur de l'amyloïde

ARNm: acide ribonucléique messager

ATP: *adenosine triphosphate*, adénosine triphosphate

AVC: accident vasculaire cérébral

BACE: *β -site amyloid precursor protein cleaving-enzyme*, bêta sécrétase 1

BCRP: *breast cancer resistance protein*, protéine de résistance au cancer du sein

bFGF: *basic fibroblast growth factor*, facteur basique de croissance des fibroblastes

BHE: barrière hémato-encéphalique

BHL: barrière hémato-liquidienne

CAA: *cerebral amyloid angiopathy*, angiopathie amyloïde cérébrale

CaMKII: *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*, protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante

CECCs: cellules endothéliales des capillaires cérébraux

CDC48: *cell division cycle 48 protein*

Cx: connexines

D-F

Da: dalton

DAMPs: *damage-associated molecular patterns*, motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires

DMSO: diméthylsulfoxyde

DRO: dérivés réactifs de l'oxygène

EDTA: éthylène diamine tétra-acétique

eIF2: *eukaryotic protein synthesis initiation factor 2*, facteur d'initiation eucaryote 2

FAD: *familial Alzheimer's disease*, forme familiale de la maladie d'Alzheimer

FITC: *fluorescein isothiocyanate*, isothiocyanate de fluorescéine

fMRI-BOLD: *blood oxygenation level dependent functional magnetic resonance imaging*, IRM fonctionnelle utilisant un signal dépendant du niveau d'oxygène sanguin

FTDP-17: *frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17*, démence fronto-temporale avec syndrome Parkinsonien liée au chromosome 17

G-I

GCN2: *general control non-derepressible-2*

GDNF: *glial cell line-derived neurotrophic factor*, facteur neurotrophe dérivé de la glie

GLUT1: *glucose transporter 1*, transporteur du glucose de type 1

GSK-3 β : *glycogen synthase kinase 3 beta*

GWAS: *genome-wide association study*, étude d'association pangénomique

hCMEC/D3: *human cerebral microvascular endothelial cell line*, lignée de cellules endothéliales cérébrales humaines

HDL: *high density lipoprotein*, lipoprotéine de haute densité

HMGB1: *high-mobility group box 1 protein*

HMG-CoA: *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A*

HPLC-MS/MS: *high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry system*

HRI: *heme-regulated inhibitor kinase*

HSP: *heat shock protein*, protéines de choc thermique

IDE: *insulin-degrading enzyme*, enzyme de dégradation de l'insuline

Ig: immunoglobuline

IgG: immunoglobuline de type G

IHC: immunohistochimie

IL: *interleukin*, interleukine

IL-1 β : *interleukin 1 beta*, interleukine 1 bêta

ILAR: *institute for laboratory animal research*

IRM: imagerie par résonance magnétique

ISF: *interstitial fluid*, fluide interstitiel

IV: intraveineux

J-L

JAs: jonctions adhérentes

JAMs: *junctional adhesion molecules*, molécules d'adhésion jonctionnelle

JGs: jonctions *gap*

JSs: jonctions serrées

kDa: kilodalton

KI: *knockin*, invalidation et remplacement d'un gène cible par un gène d'intérêt

KO: *knockout*, déficience pour un gène

LAT1: *large neutral amino acid transporter 1*

LNAAs: *large neutral amino acids*, acides aminés neutres de haut poids moléculaire

LCR: liquide céphalo-rachidien

LDL: *low density lipoprotein*, lipoprotéine de basse densité

LDLR: *low density lipoprotein receptor*, récepteur aux lipoprotéines de basse densité

LRP1: *low-density lipoprotein receptor related protein 1*

LXR: *liver X receptors*, récepteurs des oxystérols

M-O

MA: maladie d'Alzheimer

MAGUK: *membrane-associated guanylate-kinase*

MAPs: *microtubule-associated proteins*, protéines associées aux microtubules

MAPKs: *mitogen-activated protein kinases*, MAP kinases

MAPT: *microtubule-associated protein Tau*, protéine Tau associée aux microtubules

MARKs: *microtubule affinity regulating kinases*, kinases régulant l'affinité pour les microtubules

MCI: *mild cognitive impairment*, troubles cognitifs légers

MCP: mort cellulaire programmée

MDR: *multidrug resistance*, résistance multiple aux drogues

MET: microscopie électronique en transition

MFS: *major facilitator superfamily*, superfamille majeure des facilitateurs

MH: maladie de Huntington

MHC: *major histocompatibility complex*, complexe majeur d'histocompatibilité

MME: *membrane metallo-endopeptidase*

MMPs: *matrix metalloproteinases*, métalloprotéases matricielles

MND: maladie neurodégénérative

MP: maladie de Parkinson

MTBD: *microtubule-binding domain*, domaine de liaison aux microtubules

mtDNA: *mitochondrial DNA*, AND mitochondrial

NBD: *nucleotide-binding domain*, domaine de liaison aux nucléotides

ND: neurodégénérescence

NEP: néprilysine

NF-κB: *nuclear factor kappa B*

NFTs: *neurofibrillary tangles*, enchevêtrements neurofibrillaires

NGF: *nerve growth factor*, facteur de croissance nerveuse

NK: *natural killer*

NO: *nitric oxide*, monoxyde d'azote

OATP: *organic anion transporting polypeptide*

P-R

P-gp: *permeability glycoprotein*, P-glycoprotéine

PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*, motifs moléculaires associés aux pathogènes

PCIS: perfusion cérébrale *in situ*

PDGF: *platelet-derived growth factor*, facteur de croissance dérivé des plaquettes

PEN: *presenilin enhancer*

PERK: *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*

PHFs: *paired helical filament*, filaments hélicoïdaux appariés

PK: pharmacocinétique

PKA: *cyclin-AMP-dependent kinase*

PKR: *double-stranded RNA-dependent protein kinase*, protéine kinase dépendante de l'ARN double brin

PPs: *protein phosphatases*, protéines phosphatases

PRR: *pattern recognition receptors*, récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

PS1: préséniline 1

qRT-PCR: *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*

RAGE: *receptor for advanced glycation end products*, récepteur des produits de glycation avancée

RE: réticulum endoplasmique

RMT: *receptor-mediated transcytosis*, transcytose médiée par récepteur

S-U

SAM: *senescence accelerated mouse*, modèle murin de vieillissement accéléré

SAMP: *SAM-prone*, sous-souche de souris sujettes au vieillissement accéléré

SAPKs: *stress-activated protein kinases*, protéines kinases activées par le stress

SC: sous-cutané

SIM: *structured illumination microscopy*, microscopie en illumination structurée

SLA: sclérose latérale amyotrophique

SLC: *solute carriers*

SNC: système nerveux central

SNPs: *single-nucleotide polymorphisms*, polymorphismes nucléotidiques

Tau: *tubulin-associated unit*

TD: *thiamine deficiency*

TEP: tomographie par émission de positons

TGFβ: *transforming growth factor beta*, facteur de croissance transformant bêta

Thy-1 & -1.2: *thymus cell antigen 1 & 1.2*

TMD: *transmembrane domain*, domaine transmembranaire

TNF: *tumor necrosis factor*, facteur de nécrose tumorale

TTBKs: *Tau-tubuline kinases*

UNV: unité neuro-vasculaire

UPR: *unfolded-protein response*

V-Z

VLDL: *very low density lipoprotein*, lipoprotéine de très basse densité

WB: Western Blot

WT: *wild-type*, sauvage

ZO: *zonula occludens*, protéines adaptatrices cytoplasmiques

Liste des figures

Figure 1 : Implication de PKR dans les voies eIF2 α et NF- κ B..	60
Figure 2 : Représentation schématique de l'hypothèse neurovasculaire de la maladie d'Alzheimer [Adapté d'après (Nelson et al., 2016)].	115
Figure 3 : Représentation schématique des modifications de l'arbre vasculaire, des capillaires cérébraux et de la perméabilité de la BHE dans le modèle p25 après 6 semaines d'induction [Adapté d'après (Uspenskaia et al., 2004) et (Förster, 2008)].	247
Figure 4 : Représentation schématique des modifications d'expression et de fonction des récepteurs et transporteurs impliqués dans le transport de molécules endogènes (glucose, acides aminés, peptide A β et cholestérol) à la BHE dans le modèle p25 après 6 semaines d'induction.....	256

Liste des tableaux

Tableau 1 : Agrégats de protéines anormalement conformées dans les quatre principales maladies neurodégénératives [Adapté d'après (Forman et al., 2004)].....	22
Tableau 2 : Classification des différentes stratégies thérapeutiques actuellement en cours d'évaluation clinique dans la maladie d'Alzheimer (Hung and Fu, 2017; Koenig et al., 2017; Kumar et al., 2015; Sala Frigerio and De Strooper, 2016; www.clinicaltrials.gov).....	58
Tableau 3 : Bilan simplifié des principales caractéristiques pathologiques des modèles murins transgéniques couramment utilisés dans la MA.	73
Tableau 4 : Tableau bilan des modifications vasculaires et de la barrière hémato-encéphalique observées chez le patient atteint de la maladie d'Alzheimer.....	117
Tableau 5 : Tableau comparatif des dysfonctions vasculaires et de l'intégrité physique de la barrière hémato-encéphalique chez différents modèles murins transgéniques utilisés dans la maladie d'Alzheimer ainsi que chez le patient atteint de la maladie d'Alzheimer.	247
Tableau 6 : Tableau comparatif de l'expression des transporteurs impliqués dans le transport du D-glucose et des acides aminés à la barrière hémato-encéphalique chez différents modèles murins transgéniques utilisés dans la maladie d'Alzheimer ainsi que chez le patient atteint de la maladie d'Alzheimer.....	250
Tableau 7 : Tableau comparatif de l'expression des récepteurs et transporteurs impliqués dans le transport du peptide A β et du cholestérol à la barrière hémato-encéphalique chez différents modèles murins transgéniques utilisés dans la maladie d'Alzheimer ainsi que chez le patient atteint de la maladie d'Alzheimer.....	256

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies neurodégénératives (MND) constituent un groupe de pathologies d'apparition majoritairement tardive, caractérisées par la mort progressive des cellules neuronales du système nerveux central (SNC), appelée neurodégénérescence (ND). Malgré l'hétérogénéité des caractéristiques cliniques (par exemple : atteinte principalement psychique dans la maladie d'Alzheimer (MA), motrice dans la maladie de Parkinson (MP) ou association des deux dans la maladie de Huntington (MH)), les MND partagent de nombreuses similarités sur le plan cellulaire (agrégation de protéines mal repliées, mort neuronale excessive, neuroinflammation, stress oxydatif, ou encore excitotoxicité) dont les mécanismes physiopathologiques sous-jacents demeurent inconnus. En revanche, de plus en plus de travaux suggèrent que des anomalies neurovasculaires pourraient jouer un rôle clé dans la pathogénèse de nombreuses MND, et en particulier dans la MA. Cette dernière se caractérise par deux types de lésions neuropathologiques : les plaques séniles, constituées par l'agrégation extracellulaire de peptide amyloïde bêta ($A\beta$), et les enchevêtrements neurofibrillaires, constituées par l'accumulation intraneuronale de protéine Tau hyperphosphorylée (pTau). Il a ainsi été montré que des modifications de l'intégrité physique (perméabilité, morphologie...) et fonctionnelle (expression et fonction des récepteurs et transporteurs) de la barrière hémato-encéphalique (BHE), constituée par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, pourraient se produire chez les patients atteints de la MA. Cependant, l'étude de la BHE est particulièrement difficile chez l'Homme en raison du caractère très invasif des techniques expérimentales, et les résultats de ces études sont variables. De précieuses informations sur l'intégrité physique et fonctionnelle de la BHE ont ainsi été obtenues à partir de l'étude de modèles murins transgéniques. En effet, la BHE a été largement étudiée dans plusieurs modèles reproduisant certains aspects de la MA tels que l'accumulation cérébrale du peptide $A\beta$, seule ou associée à l'accumulation de pTau, ainsi que dans un modèle exprimant le principal facteur génétique de prédisposition pour la MA de type sporadique (*APOE 4*). Cependant, aucune étude n'a, à ce jour, évalué les modifications de la BHE dans un contexte de ND et d'hyperphosphorylation de Tau. Parmi les différents modèles murins de ND existants, nous avons choisi de nous intéresser au modèle p25, un modèle murin de ND avec surexpression inductible du gène humain codant pour la protéine p25, sous le contrôle du promoteur CaMKII. Ces souris présentent une mort neuronale rapide et sévère, accompagnée d'une atrophie cérébrale, d'une accumulation de pTau intracellulaire et d'une absence de plaques amyloïdes.

Le premier objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'intégrité physique et fonctionnelle de la BHE dans le modèle p25 à deux stades de ND induite par l'expression de *p25* (après 3 et 6 semaines d'induction). Nos marqueurs d'intégrité physique étaient notamment la mesure du volume vasculaire cérébral, l'expression des protéines de jonctions serrées ainsi que l'évaluation de la diffusion passive et facilitée. L'intégrité fonctionnelle de la BHE a consisté à mesurer l'expression et la fonction des principaux récepteurs et transporteurs de molécules exogènes ou endogènes au niveau de la BHE, telle que la P-glycoprotéine et les transporteurs/récepteurs impliqués dans les échanges sang-cerveau du cholestérol et du peptide A β .

Le deuxième et dernier objectif de ce travail de thèse était d'étudier les conséquences de ces modifications sur la pénétration cérébrale de médicaments à visée cérébrale. Nous nous sommes ainsi intéressés à la pharmacocinétique plasmatique et cérébrale ainsi qu'aux caractéristiques de transport à travers la BHE d'un candidat médicament destiné à traiter les MND, chez les souris saines et pathologiques (modèle p25).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I) Les maladies neurodégénératives

A. Généralités

A.1. Définition, épidémiologie et enjeux

Les maladies neurodégénératives (MND) sont un groupe de pathologies chroniques, d'évolution lente et discrète, liées au dysfonctionnement du système nerveux central (SNC). Leur évolution conduit inévitablement à la mort des cellules nerveuses, les neurones, d'où le nom de « neurodégénérescence » (ND). La grande majorité des cas intervient après 65 ans même si certaines MND peuvent toucher des adultes plus jeunes. Les MND induisent l'apparition de troubles cognitifs mais aussi comportementaux, sensoriels et moteurs dont les complications conduisent au décès. Elles sont extrêmement invalidantes et représentent une cause majeure de dépendance, voire d'institutionnalisation et/ou d'hospitalisation. Les MND les plus fréquentes sont la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (MP), la maladie de Huntington (MH) (anciennement appelée « chorée de Huntington ») et la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Erkkinen et al., 2017; invs.santepubliquefrance.fr; www.frcneurodon.org, 2017).

Les MND présentent des caractéristiques cliniques hétérogènes et variées. L'atteinte peut être principalement psychique, conduisant à un tableau clinique appelé « démence » comme c'est le cas dans la MA, ou bien motrice, comme dans la MP ou la SLA. Enfin, il peut y avoir association des deux, c'est le cas par exemple de la MH. Le diagnostic définitif des MND ne peut être réalisé que par examen du tissu cérébral, c'est-à-dire en *post-mortem*. Ainsi, c'est un faisceau d'arguments qui permet aux médecins de poser un diagnostic de probabilité. Celui-ci repose sur un examen clinique du patient, des tests neuropsychologiques pour l'évaluation des fonctions cognitives, des examens d'imagerie et la recherche de biomarqueurs dans les fluides biologiques, principalement dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Cependant, il n'existe à ce jour que très peu d'options thérapeutiques pour les MND, les seuls traitements disponibles étant surtout symptomatiques et d'efficacité variable (Erkkinen et al., 2017; World Health Organization, 2006).

Certaines MND peuvent présenter de rares formes héréditaires (formes familiales), mais la grande majorité survient sous forme sporadique, ce qui n'exclut pas l'implication de facteurs génétiques. L'étiologie des formes sporadiques est encore mal connue, mais des facteurs de risque ont été identifiés dont, entre autres, l'âge, certains facteurs génétiques comme par exemple l'allèle $\epsilon 4$ du gène codant pour l'apolipoprotéine E (ApoE) dans la MA, les maladies cardiovasculaires et en particulier l'hypertension artérielle, les traumatismes crâniens ou encore le manque d'activité physique et de stimulation cognitive (Alzheimer's Association, 2016; Baumgart et al., 2015; Blazer et al., 2015).

En 2016, les MND touchaient plus d'un million de personnes en France. Un rapport de l'institut de veille sanitaire (InVS) sur les causes de décès en France en 2008 place les MND en troisième position avec un total de 5% des décès, juste après les tumeurs (29,6%) et les maladies cardiovasculaires (27,5%). Du fait du vieillissement progressif de la population et de l'absence de traitement curatif, ce nombre devrait considérablement augmenter dans les années à venir, constituant un véritable défi de santé publique, en raison du handicap du patient, de son impact sur les familles et du coût de leur prise en charge. Ainsi, en 2001, la France lançait le premier « Plan Alzheimer » avec pour objectifs d'améliorer le diagnostic, la prise en charge et la qualité de vie des patients. Le quatrième, appelé « Plan maladies neurodégénératives 2014-2019 » a été élargi à toutes les MND. Enfin, un important programme de recherche européen, le JPND (*European joint programme for neurodegenerative disease research*) a vu le jour en 2012 (Aouba et al., 2011; Gouvernement.fr; icm-institute.org; www.neurodegenerationresearch.eu).

Au fur et à mesure que la recherche sur les MND progresse, de nombreux points communs entre ces maladies sont identifiés. Leur étude permet d'améliorer la compréhension des mécanismes mis en jeu dans ces pathologies et d'envisager des stratégies thérapeutiques communes (Bredesen et al., 2006; Taylor et al., 2002).

A.2. Points communs des maladies neurodégénératives et mécanismes cellulaires

A.2.1. Anomalie de repliement des protéines et agrégation de protéines toxiques

La principale caractéristique commune à la quasi-totalité des MND est la présence dans le parenchyme cérébral d'agrégats de protéines anormalement conformées, c'est-à-dire présentant une anomalie dans leur repliement, ce qui les rend insolubles (Guo and Lee, 2014; Jucker and Walker, 2011, 2013). Les MND font ainsi partie des maladies conformationnelles ou « protéinopathies ». Ce mécanisme pathologique est proche de celui des maladies à prions telles que la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, dans lesquelles la protéine prion cellulaire s'accumule dans le SNC sous sa forme anormalement conformée appelée PrP^{Sc}, provoquant une neurodégénérescence qui est toujours fatale. Certains chercheurs commencent à évoquer un lien entre paradigme du prion et MND (Prusiner, 2012; Walker and Jucker, 2015).

Lors de leur maturation, les protéines vont subir une série de repliements leur permettant d'acquérir une structure tertiaire (puis éventuellement quaternaire). Cette structure tridimensionnelle propre à chaque protéine, appelée conformation, est intimement liée à sa fonctionnalité (Alberts et al., 2002). Dans les MND, on retrouve une altération de la stabilité conformationnelle de certaines protéines, empêchant la protéine de se replier correctement et favorisant l'établissement de liaisons bêta intermoléculaires. Les brins peptidiques vont alors avoir tendance à s'aligner de façon parallèle en feuillets bêta plissés très stables, ce qui les rend insolubles et entraîne le dépôt et l'agrégation des protéines anormalement repliées en fibrilles (Taylor et al., 2002). L'agrégation des protéines, devenues toxiques, peut être intranucléaire, intra- ou extracellulaire. Ce phénomène d'agrégation protéique en fibrilles semble être impliqué dans de nombreux processus toxiques pour le SNC comme des perturbations du transport axonal, des dysfonctions synaptiques et mitochondriales, une excitotoxicité ou encore la génération de stress oxydatif aboutissant à la dégénérescence des neurones. Cependant, ces mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés (Forman et al., 2004; Taylor et al., 2002; Wolozin and Behl, 2000a).

De nombreuses protéines peuvent être concernées par ces anomalies de repliement. Les MND peuvent ainsi être classées en fonction de la protéine formant les agrégats, aussi appelés lésions (**Tableau 1**). Il est intéressant de noter que, malgré le fait que la plupart de ces protéines soient exprimées de façon

systémique, le phénomène d'agrégation observé dans les MND est limité au SNC (Forman et al., 2004). De plus, les neurones sont particulièrement vulnérables aux effets toxiques de ces protéines propices à l'agrégation (Taylor et al., 2002).

Protéine	Agrégat protéique / lésion	Forme <u>familiale</u> de la maladie	Gènes impliqués dans les formes familiales (mutations)	Forme <u>sporadique</u> de la maladie	Facteurs de risque associés aux formes sporadiques
Peptide bêta-amyloïde (Aβ)	Plaques amyloïdes ou Plaques séniles	Forme familiale de la maladie d'Alzheimer (FAD) ($< 1\%$ des cas)	- Gène précurseur de la protéine amyloïde : <i>APP</i> sur le chromosome 21 - Gènes préséniline 1 & 2 : <i>PSEN1</i> & <i>PSEN2</i> sur le chromosome 14	Maladie d'Alzheimer (MA)	- Age - Génétiques : Allèle <i>APOE ε4</i> - Environnementaux : activité cognitive et physique, alimentation, maladies cardiovasculaires, traumatismes crâniens...
Tau (tubulin-associated unit)	Enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs): protéine Tau hyper-phosphorylée	FTDP-17 (<i>frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17</i>)	- Gène <i>MAPT</i> (<i>microtubule-associated protein Tau</i>) sur le chromosome 17	Maladie d'Alzheimer (MA) et autres tauopathies	- Haplotype sur le gène <i>MAPT</i>
α-synucléine	Corps de Lewy	Forme familiale de la maladie de Parkinson	- Gène codant pour l'α-synucléine : <i>SNCA</i> (<i>PARK1-4</i>) sur le chromosome 4	Maladie de Parkinson (MP) , démence à corps de Lewy et atrophie multi-systématisée	- Polymorphisme sur le gène <i>SNCA</i> - Haplotype sur le gène <i>MAPT</i>
Huntingtine	Huntingtine avec poly-extension de Glutamine (PolyQ)	Maladie de Huntington (MH)	- Gène codant pour la huntingtine : <i>HD</i> sur le chromosome 4	-	-
Superoxide dismutase 1 (SOD1)	- Inclusions ubiquitinyllées filamenteuses (<i>skein-like</i>) ou sphériques (<i>Lewy body-like</i>) - Corps de Bunina	Formes héréditaires autosomiques dominante et récessive de la sclérose latérale amyotrophique	- Forme autosomique dominante : Gène codant pour la superoxide dismutase 1 : <i>SOD1</i> sur le chromosome 21 - Forme autosomique récessive : Gènes codant pour l'alsine (<i>ALS2</i>) sur les chromosomes 15 & 2 et la spartine (<i>SPG20</i>) sur le chromosome 13	Sclérose latérale amyotrophique (SLA)	- ? (à l'étude) - Lien probable avec l'activité physique, les traumatismes crâniens et l'exposition aux médicaments (dopage) et les pesticides chez les sportifs (Feddermann-Demont et al., 2017; Pupillo et al., 2017)

Tableau 1 : Agrégats de protéines anormalement conformées dans les quatre principales maladies neurodégénératives. Tableau résumé des protéines impliquées dans les agrégats, des mutations génétiques responsables des formes familiales et des facteurs de risques pour les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique [Adapté d'après (Forman et al., 2004)].

Les causes de ces défauts de repliement de protéines ne sont pas connues avec précision, même si certains facteurs de risque ont été identifiés (**Tableau 1**).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, certaines MND peuvent présenter une forme familiale de la pathologie. Dans ce cas particulier, une mutation intervient sur une protéine, la prédisposant à

l'agrégation. Cette prédisposition conduit ainsi à une survenue précoce (avant 65 ans) de la maladie, comme c'est le cas pour la MH et pour les formes familiales de la MA (FAD) et de la MP (Grateau, 1992) (**Tableau 1**). Cependant, dans la grande majorité des cas, il s'agit de formes sporadiques dont la survenue est dépendante de l'âge. Pour ces formes sporadiques, l'agrégation des protéines serait favorisée par une altération des voies cellulaires de dégradation protéique qui permettent à la cellule d'éliminer les protéines mal repliées (Hartl, 2017; Rubinsztein, 2006).

A.2.2. Défaut des voies de dégradation des protéines

La cellule possède deux grands systèmes de « contrôle qualité » et dégradation protéique sophistiqués, l'un cytosolique et l'autre au niveau du réticulum endoplasmique (RE), lui permettant de maintenir une homéostasie protéique et de se défendre contre l'accumulation de protéines mal conformées.

Le « contrôle qualité » cytosolique comporte, entre autres, les protéines chaperonnes dont le rôle est d'assister les protéines dans leur maturation afin d'éviter la formation d'agrégats (Balch et al., 2008). Les principales protéines chaperonnes impliquées dans le contrôle de l'homéostasie protéique appartiennent aux familles des HSP (*heat shock proteins*), en particulier les HSP40, HSP70 et HSP90. À leur sortie des ribosomes, les protéines mal repliées seront captées et encapsulées par les protéines chaperonnes grâce à des interactions hydrophobes. Elles pourront se replier correctement grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP), avant d'être relarguées dans le cytosol (Kim et al., 2013; Labbadia and Morimoto, 2015).

Dans le cas où les protéines mal repliées échapperaient au contrôle des protéines chaperonnes, elles peuvent être dégradées par deux systèmes enzymatiques cellulaires ;

- le système « ubiquitine-protéasome ». L'ubiquitine se lie de façon covalente aux protéines à dégrader. Ce marquage se fait par l'action coordonnée de trois enzymes; E1, E2 et E3, permettant respectivement l'activation, la conjugaison et le transfert de l'ubiquitine sur la protéine ciblée. Les protéines ainsi poly-ubiquitinylées sont dirigées vers le protéasome *via* le complexe CDC48 (*cell division cycle 48 protein*)/p97, où aura lieu leur dégradation. Le protéasome se présente sous la forme d'un « baril » et possède une cavité centrale cernée par quatre anneaux, formant un espace clos pour la digestion des protéines. Cette dégradation est ATP-dépendante (Finley, 2009; Taylor et al., 2002).

- le système « phagosome-lysosome ». Ce processus de dégradation est aussi appelé « autophagie ». C'est une voie de dégradation alternative à celle du protéasome. Elle est initiée par la formation d'une

vacuole d'autophagie, aussi appelé phagosome, qui séquestre la protéine puis fusionne avec un lysosome pour donner naissance à un autophagosome. La protéine est dégradée grâce aux quatre hydrolases acides que contient le lysosome (Yang and Klionsky, 2010).

La voie de dégradation protéique « ubiquitine-protéasome » est plus efficace que la voie « phagosome-lysosome ». Elle est ainsi privilégiée si la protéine à dégrader peut emprunter les deux voies de protéolyse. Cependant, le protéasome présente certaines limitations biophysiques ne lui permettant pas de dégrader de larges complexes protéiques ou des protéines déjà agrégées. Ces molécules sont alors redirigées vers la voie de l'autophagie (Finley, 2009; Rubinsztein, 2006; Verhoef et al., 2002). Il est intéressant de noter que des études ont montré que la dépendance d'une protéine vis-à-vis d'une dégradation par voie d'autophagie était corrélée à une tendance naturelle à l'agrégation plus importante (Ravikumar et al., 2002; Rubinsztein, 2006; Shibata et al., 2006).

Le mécanisme de défense cytosolique a tendance à décliner avec l'âge, ce qui va contribuer à la pathogénèse des MND chez les personnes âgées (Douglas and Dillin, 2010; Hartl, 2017; Hipp et al., 2014; Labbadia and Morimoto, 2015). En effet, une diminution de l'activité du protéasome est observée dans de nombreuses protéinopathies de type MND comme par exemple la MP (McNaught et al., 2003) et la MH (Seo et al., 2004). De plus, de nombreuses mutations impliquant des éléments clés de la voie « ubiquitine-protéasome » ont également été retrouvées associées au processus de ND. Des mutations de l'enzyme de transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible (E3) ou encore de CDC48 ont par exemple été retrouvées respectivement dans la MP et dans certaines démences fronto-temporales (Imai et al., 2000; Shimura et al., 2000; Watts et al., 2004). Ces observations ont également été confirmées *in vivo*. En effet, il a été montré que l'injection d'inhibiteurs pharmacologiques du protéasome à des rats adultes entraînait un syndrome Parkinsonien avec apparition d'agrégats de type corps de Lewy (McNaught et al., 2004). Enfin, bien qu'aucune mutation directement liée à une autophagie défectueuse n'ait été mise en évidence chez l'Homme, des altérations, probablement indirectes, de la voie « phagosome-lysosome » sont également suspectées dans les MND (Rubinsztein, 2006).

Le « contrôle qualité » peut également avoir lieu au niveau du RE. En effet, lorsqu'une protéine mal repliée est détectée dans le RE, une réponse de type UPR (*unfolded protein response*) est déclenchée. Celle-ci fait intervenir des protéines chaperonnes différentes de celles présentes dans le cytosol, notamment Bip, une protéine chaperonne du RE appartenant à la famille des HSP70. Le clivage de la protéine se fera ensuite dans l'appareil de Golgi (Sitia and Braakman, 2003). Si la réponse UPR est

débordée par une quantité trop importante de protéines mal repliées, elle déclenche l'apoptose de la cellule (Kaufman, 2002; Ma and Hendershot, 2001). Une suractivation de la réponse UPR est observée dans les MND (Kaufman, 2002; Ma and Hendershot, 2001).

Ainsi, il est clair qu'une altération des voies de dégradation des protéines, apparaissant avec l'âge, participe au développement des MND. Cependant, il n'est pas encore élucidé si celle-ci est une cause ou une conséquence de l'accumulation de protéines mal repliées (Rubinsztein, 2006).

A.2.3. La mort cellulaire programmée

Le terme de « mort cellulaire programmée » (MCP) fait référence au processus physiologique par lequel la cellule active des programmes moléculaires pour causer sa propre destruction. La MCP est une propriété fondamentale de tous les organismes multicellulaires. Elle est nécessaire pour le développement et le maintien de l'homéostasie des tissus sains et pour la défense vis-à-vis des cellules infectées ou altérées (Vila and Przedborski, 2003). En ce qui concerne les neurones, la MCP peut être inhibée par des facteurs solubles neurotrophiques comme par exemple le NGF (*nerve growth factor*). La balance entre l'induction et l'inhibition de la MCP détermine si un neurone vit ou meurt ; elle assure l'homéostasie neuronale (Wolozin and Behl, 2000b). Une altération de cet équilibre, dans le sens d'une MCP excessive, va entraîner une perte neuronale importante et injustifiée. Ce phénomène est notamment observé en cas de troubles ischémiques, traumatiques ou infectieux. De nombreuses études suggèrent qu'une dysrégulation de la MCP survient dans les MND (Bredesen et al., 2006; Vila and Przedborski, 2003).

Le terme d'apoptose a classiquement été employé pour décrire la MCP alors qu'il ne s'agit que d'une forme particulière de MCP (Clarke, 1990). Il existe trois formes de MCP :

- MCP de type I, appelée forme nucléaire ou apoptose. C'est la mieux connue et la plus étudiée. Elle se caractérise par des modifications morphologiques très particulières de la cellule. C'est un processus actif et séquentiel : condensation de la chromatine, fragmentation du noyau, bourgeonnement de la membrane plasmique et apparition de corps apoptotiques aboutissant à la destruction de la cellule. Il existe deux voies d'apoptose ; la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Toutes deux conduisent à l'activation de protéases à cystéine appelées caspases, dont l'activité de clivage protéique aboutit au démantèlement de la cellule (Bredesen et al., 2006; Thornberry and Lazebnik, 1998). La voie extrinsèque est déclenchée par l'activation de

« récepteurs de mort » transmembranaires comme le récepteur Fas, qui appartient à la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF) (Nagata and Golstein, 1995), et provoque l'activation des caspases -8 et -10 (Salvesen and Dixit, 1997). La voie intrinsèque est généralement déclenchée par la perméabilisation de la membrane mitochondriale qui libère dans le cytosol des molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome c. Cette voie provoque l'activation de la caspase-9 (Morishima et al., 2002; Rao et al., 2002).

Les types II et III de MCP sont appelées MCP « non-apoptotiques » et ont été beaucoup moins étudiées (Bredesen et al., 2006).

- MCP de type II, appelée forme autophagique. Il s'agit d'une voie de MCP faisant intervenir des autophagosomes (Clarke, 1990). Si le processus d'autophagie est bien décrit pour la dégradation de protéines mal repliées par exemple, son rôle dans la MCP est plus controversé. Il a été montré *in vitro* qu'un traitement par inhibiteurs de caspases inhibait la voie de la MCP de type I et redirigeait la cellule vers une MCP de type II (Yu et al., 2004). D'un autre côté, la dégradation des membranes lipidiques et des protéines cellulaires par l'autophagosome produit de l'énergie que la cellule peut réutiliser pour la production de protéines. Ce phénomène est particulièrement observé dans les cellules en cas de carence en éléments nutritifs. Plus d'études sont donc nécessaires pour mieux comprendre si ce processus autophagique favorise plutôt la survie ou la mort cellulaire (Bredesen et al., 2006; Levine and Yuan, 2005; Shimizu et al., 2004).
- MCP de type III, regroupe plusieurs phénomènes de mort cellulaire, appelées formes cytoplasmiques, ne satisfaisant ni aux critères du type I de MCP, ni à ceux du type II. Ils ne présentent ni corps apoptotiques, ni activation de caspases, et certains d'entre eux semblent avoir un mécanisme proche de celui de la nécrose (Fan et al., 2017; Formigli et al., 2000; Sperandio et al., 2000). Il a été montré qu'une suractivation des récepteurs aux facteurs trophiques peut induire la MCP ; c'est ce qui est observé par exemple en cas d'excitotoxicité (Huttunen et al., 2000; Koh et al., 1995). Or, les facteurs trophiques sont des inhibiteurs de l'apoptose. Ceci est en accord avec l'existence d'un troisième type de MCP, « non-apoptotique », dont l'intérêt pour son implication dans la neurodégénérescence est grandissant.

Les MND sont associées à de nombreux événements toxiques capables d'activer la MCP ; en particulier l'accumulation de protéines mal repliées, l'excitotoxicité, le dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydatif c'est-à-dire la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) ou encore l'activation des

« récepteurs de mort » (Bredesen et al., 2006). La réponse UPR a, par exemple, été retrouvée suractivée dans les MND en raison de l'accumulation et de l'agrégation de protéines mal repliées qu'elles présentent, induisant un stress prolongé du RE et aboutissant à une réponse apoptotique massive (Hetz and Saxena, 2017; Remondelli and Renna, 2017; Sitia and Braakman, 2003; Taylor et al., 2002).

Cette activation de la MCP dans les MND se traduit par une mort neuronale importante. Les principaux neurones touchés sont les cellules pyramidales du néocortex. La mort neuronale a été estimée entre 26 et 43% chez les patients atteints de la MA par rapport à des contrôles sains de même âge (Hynd et al., 2004; Mountjoy et al., 1983). Elle est visible en clinique sous la forme d'une atrophie cérébrale (Jack, 2016; Pirttilä et al., 1993). La mesure de l'atrophie cérébrale en imagerie structurale par résonance magnétique (IRM) fait d'ailleurs partie des 5 biomarqueurs de la MA. Les 4 autres biomarqueurs de la MA sont l'imagerie cérébrale ainsi que le dosage dans le LCR de la protéine Tau (*tubulin-associated unit*) et du peptide A β (*amyloid beta*), la mise en évidence de plaques amyloïdes dans le cerveau par tomographie par émission de positons (TEP) et enfin la mesure du métabolisme cérébral du glucose par TEP grâce au ^{18}F -FDG (fluorodésoxyglucose marqué au fluor 18) (Jack, 2011; Tarasoff-Conway et al., 2015; Whitwell et al., 2007). L'utilisation de la TEP pour la détection des NFTs dans le cerveau est en cours d'évaluation (Harada et al., 2015; Villemagne et al., 2015).

Ainsi, cibler la MCP semble être une stratégie prometteuse pour le traitement des MND. Plusieurs études *in vivo* ont montré des résultats encourageants :

- l'inhibition pharmacologique de caspases a montré un ralentissement du processus neurodégénératif dans des modèles animaux de SLA, de MP et de MH (Aharony et al., 2015; Li et al., 2000; Ona et al., 1999; Schierle et al., 1999), mais n'a malheureusement pas été suivie d'une transition en clinique.
- deux voies d'inhibition de la libération du cytochrome c des mitochondries ont été évaluées ; l'administration de Coenzyme Q10, qui stabilise le potentiel de la membrane mitochondriale et l'administration de minocycline, une tétracycline de deuxième génération, tous deux capables d'inhiber la libération du cytochrome c. Ces approches ont montré un effet neuroprotecteur dans des modèles animaux de MA, MH, MP et SLA (Cleren et al., 2008; Ferrante et al., 2002; Matthews et al., 1998; Yang et al., 2008; Zhu et al., 2002) mais les études cliniques conduites dans la MP et la MH n'ont pas été concluantes (Huntington Study Group, 2001, 2010; McGarry et al., 2017; Zhu et al., 2017).

- la stratégie d'apport de facteurs trophiques pour promouvoir la neurogenèse a, quant à elle, connu des résultats mitigés *in vivo* (Bredesen et al., 2006). Cela vient du fait qu'une suractivation des récepteurs pour les facteurs neurotrophiques peut, à l'inverse, induire la MCP. Cependant, l'évaluation clinique de l'apport du NGF par thérapie génique dans la MA est actuellement en cours et celui-ci semble très prometteur (Tuszynski et al., 2015).

Enfin, il est intéressant de noter que le rôle exact du processus de MCP dans les MND est encore une source de discussions et de controverses. En effet, la mort des neurones est un événement d'apparition relativement tardif au cours de ces maladies, notamment par rapport à la perte synaptique et aux autres dysfonctions électrophysiologiques. De nombreux modèles murins de la maladie d'Alzheimer développent d'ailleurs des plaques séniles, une perte synaptique et des troubles de la mémoire mais pas de mort neuronale (Bredesen et al., 2006). Les différents types de modèles murins de la MA seront développés dans le chapitre I) C. [Les modèles murins pharmacologiques utilisés dans la maladie d'Alzheimer.](#)

A.2.4. La neuroinflammation

Compte tenu de son rôle unique et vital pour l'organisme et de sa faible capacité de régénération, le SNC doit absolument être protégé d'une réaction inflammatoire agressive, qui pourrait compromettre son homéostasie. Il bénéficie, avec d'autres organes comme par exemple les yeux, d'un « privilège immunitaire » qui lui confère une certaine « tolérance » naturelle sur le plan immunitaire. Ce concept de tolérance a été mis en évidence en 1948 par Peter Medawar qui a montré que des greffes tissulaires réalisées dans le cerveau n'étaient pas immédiatement rejetées, contrairement à ce qui est observé en périphérie (Barker and Billingham, 1977; Hong and Van Kaer, 1999; Medawar, 1948). Sur le plan anatomique, le SNC est protégé par la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui limite à la fois le passage des pathogènes, mais aussi des cellules immunitaires systémiques avec en particulier une faible infiltration leucocytaire, ce qui participe à la protection du SNC vis-à-vis d'une réaction inflammatoire destructrice (Galea et al., 2007). Cependant, le SNC n'est pas exempt de surveillance immunitaire. Il possède son propre système immunitaire constitué par les cellules microgliales (ou « microglie ») et les astrocytes qui jouent un rôle primordial dans le maintien de son homéostasie. Les cellules microgliales, d'origine hématopoïétique, sont issues de la lignée monocyttaire et possèdent une morphologie ramifiée lui permettant de surveiller en permanence son microenvironnement (Ladeby et al., 2005). Elles représentent environ 10% des cellules du SNC. Capables de phagocytose d'où leur nom de « macrophages résidents du SNC », les cellules microgliales assurent la principale ligne de défense

immunitaire du cerveau en éliminant les agents infectieux mais aussi les neurones et synapses endommagés ou inutiles (Blinzinger and Kreutzberg, 1968; Filiano et al., 2015; Gehrmann et al., 1995).

À la moindre perturbation de l'homéostasie cérébrale ou évènement pathologique ou infectieux, les cellules microgliales reçoivent une variété de stimuli qui vont très rapidement entraîner leur activation, prolifération et migration sur le site de la lésion dans le but d'éliminer « l'agent nuisible » et inhiber ses effets néfastes sur le SNC. A l'état physiologique, ce mécanisme de défense entraîne une réponse inflammatoire aiguë et contrôlée. L'activation microgliale est caractérisée par une succession de modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles (Kettenmann et al., 2011; Ladeby et al., 2005; Ponomarev et al., 2005, 2006):

- perte des ramifications cytoplasmiques et hypertrophie du corps cellulaire pour permettre une activité phagocytaire,
- production intensive de molécules pro-inflammatoires et neurotoxiques : chimiokines et cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines (*interleukin*, IL) : IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6 et le facteur de nécrose tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF- α), DRO et monoxyde d'azote (*nitric oxide*, NO),
- sécrétion de facteurs neurotrophiques en support des neurones sains.

Ainsi, l'activation microgliale modérée participe à la protection, la croissance et la différenciation neuronale en éliminant agents pathogènes et débris cellulaires. L'activation microgliale est un phénomène extrêmement hétérogène dont l'intensité dépend du type de stimulus reçu et du contexte pathologique (Wolf et al., 2017).

Une activation microgliale est systématiquement observée dans les MND, c'est même l'une des principales caractéristiques du processus neurodégénératif. La persistance du stimulus pro-inflammatoire conduit à une suractivation microgliale et à un emballement de la réponse inflammatoire qui devient alors chronique et incontrôlée (Akiyama et al., 2000; Glass et al., 2010; Heneka et al., 2015; Nguyen et al., 2002; Ransohoff and Perry, 2009; Wyss-Coray and Mucke, 2002).

Les cellules microgliales possèdent des récepteurs spécifiques du système immunitaire inné appelés récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires ou PRRs (*pattern recognition receptors*). Ces récepteurs peuvent reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated*

molecular patterns, PAMPs) comme des virus, bactéries ou tout autre toxique exogène, ou bien aux dégâts cellulaires (*damage-associated molecular pattern*, DAMPs). Les DAMPs issus des neurones endommagés, incluent les protéines mal repliées, les agrégats protéiques intra- ou extra-cellulaires ou encore des nucléotides. Ceux-ci sont retrouvés dans le parenchyme cérébral en conditions neurodégénératives. Ainsi les agrégats de peptide A β , d' α -synucléine ou de huntingtine par exemple, vont pouvoir activer les PRRs, ce qui va se traduire par une activation microgliale et une libération de facteurs pro-inflammatoires. Cela induit la phagocytose des agrégats protéiques et des neurones environnants, contribuant ainsi à la neurodégénérescence (Santoni et al., 2015; Schwartz et al., 2013; Wolf et al., 2017). Si la réponse neuroinflammatoire aiguë est physiologique et généralement bénéfique, en ce sens qu'elle lutte contre un événement pathologique survenant dans le SNC, la réponse inflammatoire chronique est, quant à elle, plutôt préjudiciable. Elle maintient l'activation microgliale sur le long terme, ce qui perpétue le cycle inflammatoire, augmente le stress oxydatif dans le SNC et contribue finalement à l'accélération du processus pathologique dans les MND (Chen et al., 2016).

Un autre type de cellules gliales, les astrocytes, participent également au processus neuroinflammatoire dans les MND. Ces cellules, qui doivent leur nom à leur morphologie étoilée, ont divers rôles dans le SNC dont le maintien du phénotype de la BHE, le métabolisme énergétique du système nerveux, la neurotransmission et la défense immunitaire. Les astrocytes sont également très fortement activés dans les MND ; on parle alors d'astrogliose. Tout comme les cellules microgliales, les astrocytes activés sont capables de phagocytose et produisent un éventail de facteurs pro-inflammatoires, participant eux aussi à la mort neuronale et à l'entretien de l'inflammation dans les MND (González et al., 2014; Wyss-Coray and Mucke, 2002).

Le terme de « gliose réactive » est utilisé pour désigner l'activation et la prolifération des principales cellules effectrices de l'immunité innée du SNC, à savoir la microglie et les astrocytes.

Enfin, la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires provoquerait une perméabilisation de la BHE et un recrutement de leucocytes dans le SNC ; les macrophages et cellules NK (*natural killer*) d'une part, membres du système immunitaire inné, et les lymphocytes T, d'autre part, participant à la réponse immunitaire adaptative (da Fonseca et al., 2014; Keaney and Campbell, 2015; Rezai-Zadeh et al., 2009). Les macrophages, cellules NK et lymphocytes T partagent certaines caractéristiques fonctionnelles avec la microglie comme par exemple la capacité de s'accumuler autour des agrégats protéiques et de les phagocyter (Wyss-Coray and Mucke, 2002). Ils exercent également leur activité de phagocytose vis-à-vis

des neurones présentant une démyélinisation ou toute autre altération axonale, ce qui suggère leur implication dans le processus de neurodégénérescence (Raivich et al., 1998).

L'inflammation associée aux MND n'est généralement pas le facteur d'initiation de la pathologie. En revanche, de plus en plus d'études montrent que la réponse inflammatoire médiée par la microglie et les astrocytes est un facteur précoce et très important de la mort neuronale et de la progression de ces maladies (Chen et al., 2016). L'analyse *post-mortem* de cerveaux de patients atteints de MND a révélé une activation et prolifération microgliale dans des zones proches des neurones dégénérants (Bouvier et al., 2016; Imamura et al., 2003; Sapp et al., 2001). Une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6 a également été retrouvée dans le plasma de patients atteints de la MH suggérant son utilisation comme biomarqueur potentiel de la maladie (Chang et al., 2015; Dalrymple et al., 2007).

Dans la MA, il a été montré que des cellules microgliales activées sont co-localisées avec les plaques amyloïdes. De plus, des études d'association pangénomiques ont mis en évidence l'existence de polymorphismes nucléotidiques (*single-nucleotide polymorphisms*, SNPs) comme facteurs de risque de la MA sur des protéines impliquées dans la phagocytose dépendante de la microglie (Zhang et al., 2013). Ainsi, il est maintenant clair que la neuroinflammation joue un rôle fondamental dans la MA comme dans toutes les MND. Une stratégie thérapeutique visant à limiter ce phénomène neuroinflammatoire a été envisagé pour MA. Lim et collaborateurs ont montré que l'administration d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), l'ibuprofène, chez la souris Tg2576, un modèle murin de surexpression de la protéine précurseur de l'amyloïde humain (APP), provoquait une diminution de l'activité inflammatoire cérébrale et des dépôts d'A β (Lim et al., 2000). Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres AINS, comme par exemple le NFP (*nitric acide flurbiprofen*), un dérivé du flurbiprofène (Hausse-Wegrzyniak et al., 1999; Wenk et al., 2002). En effet, les AINS inhibent la synthèse des prostaglandines par les enzymes cyclo-oxygénases (COX) et régulent le processus inflammatoire en bloquant les voies de signalisation des interleukines, principalement IL-1 β et IL-6 (Zandi and Breitner, 2001). Cependant, le traitement par AINS ne serait efficace chez l'Homme que s'il est initié en amont du développement du processus inflammatoire, c'est-à-dire en prévention de la MA, ce qui n'est donc pas envisageable (Szekely et al., 2004; Wang et al., 2015; Wenk, 2003; Zandi and Breitner, 2001).

A.2.5. Autres mécanismes pathogéniques

Les MND partagent également d'autres mécanismes pathogéniques dont, entre autres, les dysfonctions mitochondriales et le stress oxydatif ainsi que l'excitotoxicité.

Les mitochondries sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires comme la régulation de la chaîne respiratoire, du métabolisme énergétique, ou de l'homéostasie calcique et jouent un rôle particulièrement important dans la régulation de la survie et de la mort cellulaire (Tait and Green, 2013). Il a été montré que des dysfonctionnements des mitochondries apparaissent lors du vieillissement, le premier facteur de risque des MND. Du fait de leurs besoins énergétiques importants, les neurones et les cellules musculaires sont les principales victimes de ces dysfonctionnements (Lin and Beal, 2006). Ceux-ci incluent l'accumulation de mutations dans l'ADN mitochondrial (mtDNA) et une production excessive de DRO (responsables du stress oxydatif) et contribuent finalement au processus neurodégénératif. Les DRO sont des produits normaux de l'activité respiratoire mitochondriale et sont contrebalancés, en conditions physiologiques, par la production d'antioxydants. Lorsque l'activité mitochondriale est altérée, en cas de mutations de l'ADN mitochondrial par exemple, un cercle vicieux se met en place avec une diminution des défenses anti-oxydantes et une production excessive de DRO qui vont à leur tour endommager l'activité mitochondriale. Il a aussi été observé que lors du processus neurodégénératif, la voie intrinsèque de l'apoptose impliquant les mitochondries constitue la forme la plus commune de mort cellulaire. Enfin, il a été montré que les mitochondries interagissent avec plusieurs protéines impliquées dans les lésions protéiques retrouvées dans les MND. Ainsi, les mitochondries sont suspectées d'avoir un rôle central dans la pathogénèse des MND, même si les mécanismes conduisant à la neurodégénérescence peuvent différer d'une maladie à l'autre (DiMauro and Schon, 2008; Lin and Beal, 2006). Dans la MA par exemple, il a été montré que la génération de DRO mitochondriaux et l'inhibition du métabolisme énergétique participaient, *via* différentes voies d'activation enzymatique, à l'augmentation des dépôts amyloïdes et à la phosphorylation aberrante de la protéine Tau (Lovell et al., 2004; Tamagno et al., 2005). Le peptide A β est capable, en retour, de se lier avec une protéine de la matrice mitochondriale (*A β -binding alcohol dehydrogenase*, ABAD) pour activer la libération de DRO et induire l'apoptose (Crouch et al., 2005; Lustbader et al., 2004; Manczak et al., 2006). Enfin, il a été mis en évidence que les patients atteints de la MA présentent significativement plus de mutations de l'ADN mitochondrial que les contrôles sains (Coskun et al., 2004).

Le terme d'excitotoxicité fait référence au processus pathologique au cours duquel les neurones sont détruits à cause de leur hyper-activation par des neurotransmetteurs excitateurs dont le principal dans le SNC est le glutamate (Collingridge and Lester, 1989). En conditions physiologiques, le glutamate se lie à ses récepteurs post-synaptiques ionotropiques (NMDA, AMPA et KAR) et induit l'entrée dans le neurone de cations (notamment calcique, Ca²⁺), ce qui déclenche le potentiel d'action. Cette excitation est de

courte durée et est suivie d'une dépression. Des facteurs pathologiques comme par exemple un déficit du métabolisme énergétique, des dysfonctions mitochondriales, le stress oxydatif ou encore l'exposition à certains agents pathogènes peuvent entraîner une augmentation de la vulnérabilité des neurones au glutamate. Dans ces conditions, il y a une diminution de l'inhibition des récepteurs ionotropiques par l'ion magnésium (Mg^{2+}), ce qui conduit à une excitation neuronale aberrante et persistante. Le glutamate devient alors une « excitotoxine » capable de détruire les neurones par entrée massive de calcium, production de radicaux libres et initiation de la cascade apoptotique (Choi, 1988a, 1988b, 1992). Le processus excitotoxique démarre dans les dendrites au niveau post-synaptique. Il peut soit provoquer une dégénérescence synaptique locale, aboutissant à une diminution progressive de la plasticité synaptique, ou bien se propager jusqu'au soma et provoquer la mort du neurone. Le phénomène d'excitotoxicité a été observé en cas de lésion de la moelle épinière, d'accident vasculaire cérébral ou de traumatisme crânien mais aussi dans toutes les MND dans lesquelles il participe à la mort neuronale (Ikonomidou and Turski, 1995; Mattson, 2003; Mehta et al., 2013).

B. La maladie d'Alzheimer

B.1. Définition, généralités et données épidémiologiques

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par une perte progressive des fonctions cognitives se traduisant par un déclin du langage et de la mobilité, des difficultés à effectuer les tâches du quotidien et des troubles psychomoteurs et comportementaux importants (Alzheimer's Association, 2016; Hynd et al., 2004).

La MA doit son nom à un psychiatre allemand, Aloïs Alzheimer, qui décrit en 1907 des symptômes cliniques atypiques ; « un délire de jalousie suivi d'une désintégration des fonctions intellectuelles », chez une patiente âgée de 51 ans du nom d'Auguste Deter. À la suite du décès de cette patiente, son cortex cérébral est observé au microscope par Aloïs Alzheimer qui décrit des lésions histologiques jusqu'alors inconnues et qu'il appelle « petits foyers miliars » et « faisceaux denses de fibres » (Maurer et al., 1997; Ramirez-Bermudez, 2012; Strassnig and Ganguli, 2005). Ces lésions correspondent aux plaques séniles et aux enchevêtrements neurofibrillaires, les deux éléments caractéristiques de la MA.

La MA est la plus fréquente et la plus étudiée des MND (icm-institute.org). C'est aussi la principale cause de démence puisqu'elle en serait l'origine dans environ 70% des cas, les 30% restants sont

principalement des démences vasculaires, des démences à corps de Lewy et des démences fronto-temporales (Kumar et al., 2015; www.who.int). Même si un léger déclin cognitif apparaît naturellement au cours du vieillissement, les troubles liés à l'apparition d'une démence sont quantitativement et qualitativement plus importants (Hynd et al., 2004). À L'heure actuelle, la MA toucherait environ 25 millions de personnes dans le monde. Il est estimé que ce chiffre devrait au moins tripler d'ici 2050, pour atteindre environ 80 millions de personnes. Cela représente l'apparition d'un nouveau cas toutes les 33 secondes dans le monde, soit approximativement 1 million de nouveaux cas par an. En France, le coût annuel directement lié à la MA est d'environ 10 milliards d'euros. Sa progression ainsi que sa charge économique et sociale font de la MA une préoccupation majeure pour tous les pays industrialisés dont la population est vieillissante, et un véritable enjeu éthique, socio-économique et de santé publique pour l'avenir (Gallez, 2005; icm-institute.org).

La prévalence de la MA augmente de façon drastique avec l'âge, qui en est d'ailleurs le premier facteur de risque. Elle est d'environ 3% chez les sujets âgés de 65 à 74 ans, 19% chez les sujets entre 75 et 84 ans pour atteindre 47% après 85 ans (Evans et al., 1989). Les femmes semblent surexposées à la maladie ; sur 25 patients atteints de la MA, on compte 15 femmes et 10 hommes (Brookmeyer et al., 1998; icm-institute.org). Cette inégalité homme-femme pourrait provenir de la différence d'espérance de vie entre les deux sexes, ou pourrait être d'origine hormonale. Plusieurs études ont en effet montré que l'apparition de la maladie serait liée à la diminution des taux d'hormones, estrogènes et androgènes, observée respectivement lors de la ménopause et andropause, et que les femmes traitées par thérapie hormonale pendant la ménopause seraient à moindre risque de développer la MA (Atwood, 2005; Brookmeyer et al., 1998).

La MA existe sous deux formes ; une forme familiale, d'apparition précoce, qui ne représente que moins d'1% des cas, et une forme sporadique, d'apparition plus tardive. Après la pose du diagnostic de présomption de MA, l'espérance de vie est en général de 7 à 10 ans (Morris et al., 2012; Yates and McLoughlin, 2008). Les formes familiales de la maladie sont liées à des mutations génétiques (**Tableau 1**), et sont généralement associées à une évolution plus rapide et plus agressive de la maladie (Bertram et al., 2010).

B.2. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe dans la MA deux types de lésions neuropathologiques caractéristiques ; les plaques séniles, constituées par l'agrégation extracellulaire de peptide A β , et les

enchevêtrements neurofibrillaires, constituées par l'accumulation principalement intra-neuronale de protéine Tau hyperphosphorylée. Ces lésions neuropathologiques s'accompagnent d'une perte neuronale importante, notamment dans le système cholinergique, aboutissant à une dysrégulation de la neurotransmission cholinergique. En effet, une déficience fonctionnelle de la voie cholinergique impliquant le récepteur nicotinique neuronal à l'acétylcholine (*acetylcholine receptor*, AChR) a été observée dans la MA (Barrantes et al., 2010).

B.2.1. La protéine Tau et les enchevêtrements neurofibrillaires

Les enchevêtrements neurofibrillaires (*neurofibrillary tangles*, NFTs), ont été observés pour la première fois par Aloïs Alzheimer en 1907 chez sa patiente atteinte de la MA. Ils ne sont cependant pas spécifiques de la MA et sont également retrouvés dans d'autres MND appelées tauopathies comme par exemple la démence fronto-temporale avec syndrome Parkinsonien liée au chromosome 17 (*frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17*, FTDP-17), la maladie de Pick ou encore la dégénérescence corticobasale (Iqbal et al., 2010; Sergeant et al., 2005).

Les NFTs sont constitués de filaments hélicoïdaux appariés (*paired helical filaments*, PHFs) dont le principal constituant est la protéine Tau hyperphosphorylée (Arendt et al., 2016).

B.2.1.1. Structure et fonction de la protéine Tau en conditions physiologiques

Tau est une protéine cytosolique appartenant à la famille des protéines associées aux microtubules (*microtubule-associated proteins*, MAPs). Présente en abondance dans les neurones, la protéine Tau joue un rôle important dans le maintien de la structure et de la polarité cellulaire ainsi que du transport axonal *via* son interaction avec les microtubules du cytosquelette (Arendt et al., 2016; Drechsel et al., 1992; Meraz-Ríos et al., 2010).

Chez l'Homme, la protéine Tau est codée par le gène *MAPT* (*micro-tubule-associated protein Tau*), situé sur le chromosome 17, et contenant 16 exons. Au niveau du SNC, les exons 2, 3 et 10 subissent un épissage alternatif conduisant à la synthèse de 6 isoformes différentes de la protéine dont les séquences varient entre 352 et 441 acides aminés (Andreadis, 2005; Meraz-Ríos et al., 2010). Les 6 isoformes diffèrent entre elles par le nombre de régions répétées au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine (Avila et al., 2016). Les 6 isoformes de la protéine Tau sont retrouvées dans les neurones chez l'Homme à l'âge adulte, mais semblent se répartir différemment au sein de ceux-ci ; certaines isoformes

étant plutôt associées au nucléole, tandis que d'autres seraient principalement retrouvées au niveau axonal (Binder et al., 1985).

La structure primaire de la protéine Tau se compose de trois domaines :

- Le domaine de projection, au niveau N-terminal, est le plus éloigné des microtubules. Il est lui-même composé d'un domaine acide, en position N-terminale, et d'un domaine riche en prolines. Ce dernier permet à la protéine Tau d'interagir directement ou indirectement avec certains composants des microtubules comme par exemple les filaments d'actine, mais aussi avec la membrane plasmique ou encore des organites intracellulaires comme par exemple les mitochondries.
- Le domaine constant, flexible, permet à la protéine de se replier.
- Le domaine de liaison aux microtubules, au niveau C-terminal, va directement interagir avec les microtubules. Il contient deux sous-domaines ; un domaine C-terminal et un domaine de liaison à proprement parlé appelé MTBD (*microtubule-binding domain*). Ce dernier est constitué de 3 ou 4 motifs répétés (appelés 3R ou 4R) de liaison aux microtubules selon l'isoforme, permettant de favoriser la polymérisation des hétéro-dimères de tubuline (α - et β -tubuline) en microtubules (Avila et al., 2016; Ballatore et al., 2007; Gustke et al., 1994; Savelieff et al., 2013).

En conditions physiologiques, l'activité de la protéine Tau est régulée par un ensemble de modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, la phosphorylation, l'acétylation, la déamidation, la méthylation ou encore l'ubiquitinylation (Avila et al., 2016). La phosphorylation, en particulier, permet de contrôler l'affinité de la protéine Tau pour les microtubules. Lorsque la protéine Tau est phosphorylée, son affinité pour les microtubules diminue ce qui entraîne la rupture de la liaison Tau/microtubules. Tau est phosphorylée par différentes kinases comme les MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), les TTBKs (*Tau-tubuline kinases*), les kinases dépendantes des cyclines (en particulier Cdk5), les MARKs (*microtubule affinity regulating kinases*), CaMKII (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*), PKA (*cyclin-AMP-dependent kinase*), GSK-3 β (*glycogen synthase kinase 3 beta*), les caséine kinases I et II ou encore les SAPKs (*stress-activated protein kinases*) (Balaraman et al., 2006; Buée-Scherrer and Goedert, 2002; Drewes et al., 1992; Kimura et al., 2014). Tau est déphosphorylée par des phosphatases (*protein phosphatases*, PPs), majoritairement PP-1, -2A, -2B (calcineurine), -2C et -5 (Gong

et al., 1993; Liu et al., 2005). La protéine Tau peut donc passer d'un état phosphorylé à un état déphosphorylé selon les besoins de la cellule.

B.2.1.1. Rôle pathologique de la protéine Tau hyperphosphorylée dans la maladie d'Alzheimer

Un déséquilibre de la régulation de la phosphorylation de la protéine Tau dans le sens d'une hyperphosphorylation est retrouvé dans les tauopathies et en particulier dans la MA (Arendt et al., 2016; Pritchard et al., 2011). Cette hyperphosphorylation, qui semble toucher indistinctement les 6 isoformes de la protéine, provoque une diminution de l'affinité de Tau pour les microtubules et la rupture des liaisons Tau/microtubules (Goedert et al., 1992). La déstabilisation des microtubules entraîne une altération du transport axonal ainsi que des dysfonctionnements synaptiques et contribuerait au processus neurodégénératif (Arendt, 2004). Enfin, l'accumulation cytosolique de protéines Tau hyperphosphorylées favorise leur assemblage en PHFs, pour aboutir à la formation des NFTs (Meraz-Ríos et al., 2010).

L'hyperphosphorylation de la protéine Tau peut résulter soit d'une augmentation de l'activité des kinases endogènes, soit d'une diminution de l'activité des phosphatases. Des études réalisées sur des cerveaux de patients atteints de la MA ont mis en évidence une diminution significative de l'expression et de l'activité de PP-2A, ce qui pourrait expliquer pourquoi d'autres protéines, comme par exemple la β -tubuline, sont également retrouvées hyperphosphorylées dans la MA (Gong et al., 1993, 1995; Sontag et al., 2004; Vogelsberg-Ragaglia et al., 2001). Par ailleurs, d'autres études ont montré qu'une diminution de l'expression de PP-2A provoquerait une activation des kinases CaMKII, MAPK et SAPK (Bennecib et al., 2001; Kins et al., 2003), ce qui participe au processus d'hyperphosphorylation.

Une corrélation a été mise en évidence entre la densité des NFTs et la progression de la MA, en particulier la gravité de l'atteinte cognitive chez les patients atteints de la MA (Delacourte et al., 1999; Guillozet et al., 2003). Cependant, les NFTs ne seraient pas des éléments neurotoxiques dans la MA. En effet, la formation des NFTs serait plutôt un mécanisme de protection mis en place par les neurones pour limiter la diffusion des monomères et oligomères solubles de protéines Tau hyperphosphorylées (Lee et al., 2005). Ceux-ci, qui sont les formes intermédiaires apparaissant en amont des NFTs, seraient responsables des effets neurotoxiques observés dans les tauopathies (Gerson et al., 2016). Toutefois, les effets neurotoxiques de la protéine Tau hyperphosphorylée et son rôle sur le déclin cognitif n'est pas encore élucidé à ce jour (Arendt et al., 2016).

B.2.2. Le peptide A β et les plaques séniles

Les lésions amyloïdes cérébrales constituent le deuxième type de lésions caractéristiques de la MA. Elles ont été observées par Emil Redlich dès 1898 puis par Aloïs Alzheimer en 1907, qui les a associées à la MA, mais ce n'est qu'en 1984 que le peptide A β , leur principal constituant, est identifié par Glenner et collaborateurs (Glenner and Wong, 1984). Il existe en réalité deux types de lésions amyloïdes différentes selon la localisation des dépôts ; les plaques séniles, ou plaques amyloïdes, localisées au niveau du parenchyme cérébral, et qui sont observées dans la MA et dans le syndrome de Down (Duyckaerts et al., 2009; Hyman, 1992) et les dépôts périvasculaires qui sont observés dans l'angiopathie amyloïde cérébrale (*cerebral amyloid angiopathy*, CAA) (Prelli et al., 1988).

Le terme d'amylose, ou amyloïdose, désigne un ensemble de pathologies caractérisées par l'agrégation extracellulaire de protéines ou peptides présentant une configuration particulière et très stable appelée feuillet bêta plissés. Ces agrégats peuvent former des fibrilles, d'environ 10 nm de diamètre qui, associées avec des structures neurales dégénératives et des cellules astrocytaires et microgliales activées, forment les dépôts amyloïdes. Dans la MA, ces dépôts sont généralement de forme sphérique, peuvent atteindre 200 μ m de diamètre, et sont principalement retrouvés au niveau du cortex et de l'hippocampe des patients (Perl, 2010; Yates and McLoughlin, 2008). D'autres structures extracellulaires, appelées plaques diffuses, peuvent aussi être observées dans le cerveau des patients atteints de la MA. Ces dépôts, plus petits et de morphologie moins bien définie seraient des formes immatures des plaques amyloïdes et sont couramment observées chez l'individu âgé en l'absence de tout déficit cognitif (Morris et al., 1996; Wolf et al., 1999).

Le type d'amylose dépend de la protéine en cause. Dans la MA, il s'agit du peptide A β , un monomère amphiphile de 4 kilodalton (kDa), provenant du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (*amyloid protein precursor*, APP).

B.2.2.1. Formation de l'A β

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire, principalement exprimée dans le SNC, et dont les fonctions physiologiques ne sont pas connues avec précision (Beyreuther et al., 1993; Yates and McLoughlin, 2008). L'APP pourrait être impliquée dans la synaptogenèse, la migration neuronale, l'adhésion et la signalisation cellulaire ou encore le transport des métaux mais des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces hypothèses (Ciuculescu et al., 2005; Sosa et al., 2017; Wang et al., 2017). Le gène codant pour l'APP est situé sur le chromosome 21, ce qui explique le

lien existant entre syndrome de Down et MA. En effet, du fait de la présence d'une copie supplémentaire du chromosome 21, les individus présentant un syndrome de Down sont sujets à une surproduction d'APP et il est estimé que l'incidence globale de la MA chez ces individus est 3 à 5 fois plus élevée que dans la population générale (www.alzheimer.ca).

L'APP se compose d'un ectodomaine (extracellulaire) très développé (environ 70% de la protéine), d'un domaine transmembranaire unique et d'un domaine intracellulaire réduit appelé AICD (*APP intracellular domain*) (O'Brien and Wong, 2011). L'ectodomaine de la protéine APP est lui-même divisé en plusieurs régions ; un peptide signal en position N-terminale, des domaines de fixation à l'héparine et aux ions cuivre, un domaine acide, un domaine central et enfin un domaine charnière de liaison entre l'ectodomaine et le domaine transmembranaire de l'APP. L'ectodomaine est richement glycosylé, ce qui permettrait à l'APP de participer aux mécanismes d'adhésion cellulaire (Dulubova et al., 2004; Evin and Weidemann, 2002).

Le métabolisme de l'APP se fait suivant deux voies de clivage : la voie non-amyloïdogénique, majoritaire en conditions physiologiques, et la voie amyloïdogénique, minoritaire et qui aboutit à la formation du peptide A β .

- La voie non-amyloïdogénique représente environ 90% du métabolisme de l'APP en conditions physiologiques. Elle fait intervenir deux enzymes successivement ; l' α -sécrétase et la γ -sécrétase. Il existe 3 α -sécrétases appartenant à la famille des ADAMs (*A desintegrin and metalloproteases*) ; ADAM-9, -10 et -17 (Allinson et al., 2003). Ce clivage libère le peptide N-terminal α -APP soluble (sAPP α), dans le milieu extracellulaire. Le fragment C-terminal restant, appelé CTF α (ou C83), est ensuite clivé par la γ -sécrétase au niveau du domaine transmembranaire pour donner le domaine AICD, cytoplasmique, et le fragment p3, extracellulaire (Chow et al., 2010; De Strooper and Annaert, 2000; Plummer et al., 2016). Il n'est pas encore clair si le fragment p3 est plutôt neuroprotecteur ou neurotoxique puisque des études différentes soutiennent les deux hypothèses (Han et al., 2011; Wei et al., 2002). Cependant, de très nombreuses études ont démontré, *in vitro*, que sAPP α possédait des propriétés neuroprotectrices et neurotrophiques (Araki et al., 1991; Caillé et al., 2004; Furukawa and Mattson, 1998; Goodman and Mattson, 1994; Greenberg et al., 1995; Mattson et al., 1993). Ainsi, l'activation de la voie non-amyloïdogénique de l'APP constitue une aire de recherche pour le traitement de la MA (Fahrenholz, 2007; Vincent and Govitrapong, 2011; Yan et al., 2017).

- La voie amyloïdogénique représente environ 10% du métabolisme de l'APP en conditions physiologiques. Cette voie métabolique est cependant augmentée dans certaines pathologies, entraînant une augmentation de production du peptide A β , comme c'est le cas dans la MA. La voie amyloïdogénique fait également intervenir deux enzymes successivement ; la β -sécrétase et la γ -sécrétase. La β -sécrétase clive l'APP au niveau de 2 sites de la séquence correspondant au peptide A β : au niveau du 1^{er} résidu pour le site β et du 11^{ème} résidu pour le site β' , libérant le peptide N-terminal β -APP soluble (sAPP β) dans l'espace extracellulaire. Le fragment C-terminal restant, appelé CTF β (C99) ou CTF β' (C89) selon le site du clivage β , est ensuite clivé par la γ -sécrétase au niveau de deux sites principalement, libérant les peptides A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ dans l'espace extracellulaire et les deux domaines AICD correspondants dans le milieu intracellulaire (De Strooper and Annaert, 2000; Prabhu et al., 2012; Zhang et al., 2012). Le peptide A β ₁₋₄₀ est généralement le plus abondant (plus de 80% des peptides A β). Le peptide A β ₁₋₄₂, plus long de 2 acides aminés, est en revanche plus hydrophobe et plus amyloïdogénique, c'est-à-dire particulièrement prompt à l'agrégation, il serait donc plus « pathologique ». Si A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ sont tous les deux retrouvés dans le cerveau, A β ₁₋₄₂ semble être le principal peptide présent dans les plaques séniles (Murphy and LeVine, 2010; Querfurth and LaFerla, 2010; Selkoe, 2001). Il existe deux β -sécrétases appartenant à la famille BACE (*β -site APP cleaving enzyme*) ; BACE1 et BACE2. Cependant, BACE2 n'est que très peu exprimée au niveau cérébral et BACE1 est considérée comme étant la principale β -sécrétase responsable de la formation du peptide A β (Bennett et al., 2000; Hunt and Turner, 2009). BACE1 est une protéase transmembranaire, essentiellement exprimée au niveau de la membrane du réseau trans-golgien, des endosomes et de la membrane plasmique, et dont le site actif de clivage se trouve du côté luminal de la membrane. Le lieu exact du clivage de l'APP par BACE1 est encore controversé et certains chercheurs suggèrent que le clivage nécessite une internalisation préalable de l'APP (Hunt and Turner, 2009; Huse et al., 2000; Walter et al., 2001). Quoi qu'il en soit, BACE1 est une enzyme essentielle pour la formation du peptide A β . En effet, des souris possédant le gène humain muté de l'APP les prédisposant à la MA (Swedish mutation) mais n'exprimant pas BACE1 (souris knockout (KO) pour BACE1), ne présentent pas de pathologie amyloïde (Laird et al., 2005; Ohno et al., 1978). De plus, les niveaux d'expression et d'activité de BACE1 ont été retrouvés significativement augmentés chez les patients atteints de la MA (Fukumoto et al., 2002; Harada et al., 2006; Li et al., 2004). De son côté, l'activité γ -sécrétase est assurée par un complexe enzymatique faisant intervenir 4 protéines ; la préséniline 1 ou 2 (PS1 ou PS2), la protéine PEN-2

(*presenilin enhancer 2*), la protéine APH1 (*anterior pharynx-defective 1*) et la nicastrine. De la même façon que pour BACE1, ce complexe semble exprimé au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau des membranes du réseau trans-golgien et des endosomes, ce qui supporte en partie l'hypothèse de l'internalisation de l'APP pour permettre son clivage par voie amyloïdogénique (Chyung et al., 2005; Vetrivel et al., 2004; Zhang et al., 2012). Les présénilines, en particulier la préséniline 1, semblent être particulièrement importantes pour l'activité catalytique. Des mutations touchant les gènes codant pour les présénilines 1 et 2 (*PSEN1* et *PSEN2*) sont ainsi retrouvées dans les formes familiales de la MA (Kowalska et al., 2004; www.molgen.u.ac.be). Enfin, du fait de leur rôle clé dans la formation de l'A β , les β - et γ -sécrétases sont des cibles intéressantes dans la recherche de traitements pour la MA (Rochette and Murphy, 2002; Selkoe, 2001).

B.2.2.2. Elimination cérébrale de l'A β

Suite au clivage amyloïdogénique de l'APP, les monomères d'A β , solubles, sont libérés dans le milieu extracellulaire. Ceux-ci seront, en conditions physiologiques, rapidement éliminés du parenchyme cérébral par dégradation enzymatique, transport au travers de la BHE (systèmes d'efflux médiés par des récepteurs ou transporteurs) ou élimination périvasculaire *via* le système glymphatique (Tarasoff-Conway et al., 2015; Zlokovic, 2004).

La dégradation enzymatique du peptide A β au niveau cérébral se fait principalement par deux protéases ; la néprilysine (NEP) et l'enzyme de dégradation de l'insuline (*insulin-degrading enzyme*, IDE) (Tarasoff-Conway et al., 2015; Yoon and Jo, 2012). La NEP est une enzyme membranaire ubiquitaire appartenant à la famille des métalloprotéases dépendantes du zinc (Erdös and Skidgel, 1989). Dans le SNC, elle est principalement exprimée au niveau des terminaisons axonales des neurones présynaptiques et de l'endothélium vasculaire (Bayes-Genis et al., 2016; Miners et al., 2008). Principale enzyme de la dégradation de l'A β , la NEP est capable de métaboliser les formes monomériques (A β_{1-40} et A β_{1-42}) mais aussi oligomériques d'A β (Iwata et al., 2001; Tarasoff-Conway et al., 2015). Des études ont montré d'une part, que l'expression et l'activité de la NEP sont diminuées dans la MA (Carpentier et al., 2002; Wang et al., 2005, 2010) et, d'autre part, que le niveau d'expression de la NEP est inversement corrélé aux concentrations cérébrales de peptide A β (Akiyama et al., 2001; Eckman et al., 2006; Hellström-Lindahl et al., 2008). De plus, des mutations sur le gène codant pour la NEP (le gène *MME*, *membrane metallo-endopeptidase*) ont été identifiées et seraient associées à un risque plus élevé de développer la MA (Helisalmi et al., 2004). L'IDE est aussi une métalloprotéase dépendante du zinc exprimée dans différents

organes comme le foie, les muscles, les testicules et le cerveau mais, à la différence de la NEP, elle est majoritairement retrouvée au niveau cytosolique (Kuo et al., 1993; Miners et al., 2008). Dans le SNC, elle est principalement exprimée dans les neurones, mais elle a également été retrouvée dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux ou encore dans les plaques amyloïdes (Bernstein et al., 1999; Morelli et al., 2004). De la même façon que pour la NEP, des études ont suggéré une corrélation négative entre l'expression de l'IDE et les concentrations cérébrales de peptide A β (Farris et al., 2003). En effet, une diminution de l'expression et de l'activité cytosolique de l'IDE a été retrouvée chez des patients atteints de la MA (Cook et al., 2003; Miners et al., 2008; Pérez et al., 2000), bien que certaines études aient rapporté des résultats légèrement différents (Caccamo et al., 2005; Zhao et al., 2007).

Le peptide A β produit au niveau cérébral peut également être éliminé par transport au travers de la BHE. Deux mécanismes d'élimination du cerveau vers le sang *via* la BHE ont été mis en évidence ; la transcytose, qui fait intervenir le récepteur LRP1 (*low-density lipoprotein receptor related protein 1*) (Deane et al., 2004a; Shibata et al., 2000; Storck et al., 2016), et l'efflux cérébral médié par des transporteurs de la famille ABC (*ATP-binding cassette*). Trois transporteurs ABC ont pour l'instant été identifiés *in vivo* pour leur participation à l'efflux cérébral du peptide A β à la BHE : ABCB1 (ou P-gp, *permeability glycoprotein*), ABCG2 (ou BCRP, *breast cancer resistance protein*) et ABCG4 (Do et al., 2012; Dodacki et al., 2017; Mahringer and Fricker, 2016). Ces transporteurs et le récepteur LRP1 seront décrits plus en détails dans la partie II) B.2. Mécanismes de transport au travers de la barrière et leurs modulations dans le cadre de la MA seront évoqués dans la partie II) C.3.2. Transport du peptide A β .

Enfin, il a été récemment montré que le peptide A β cérébral peut également être éliminé par voie périvasculaire, ce qui correspond au drainage du fluide interstitiel cérébral (*interstitial fluid*, ISF) par le LCR, *via* le système glymphatique (Iliff et al., 2012). Cette voie d'élimination représenterait jusqu'à 65% de la clairance totale du peptide A β cérébral (Tarasoff-Conway et al., 2015). Les échanges entre l'ISF et le LCR se font grâce aux pieds astrocytaires qui entourent le réseau vasculaire et plus particulièrement aux aquaporines 4, protéines membranaires permettant le passage de l'eau, qu'ils contiennent. Une étude réalisée sur des souris KO pour l'aquaporine 4 a montré que la clairance cérébrale de l'A β était fortement diminuée chez ces souris par rapport aux contrôles (Iliff et al., 2012). La même équipe a montré que la clairance glymphatique était diminuée d'environ 40% chez les souris âgées, par rapport à des souris jeunes, à cause principalement d'une altération des échanges ISF-LCR (Kress et al., 2014). Ces résultats suggèrent que les mécanismes impliqués dans la voie glymphatique d'élimination du peptide A β cérébral

sont altérés avec l'âge, le premier facteur de risque de la MA (Kress et al., 2014; Tarasoff-Conway et al., 2015).

Ainsi, tous ces systèmes de clairance contribuent, ensemble, à la régulation des concentrations cérébrales d'A β . Une diminution de leur activité ou fonction serait en faveur d'une accumulation cérébrale de peptide A β et donc du développement de la MA (Tarasoff-Conway et al., 2015).

B.2.2.3. Formation des plaques séniles et rôle physiopathologique dans la maladie d'Alzheimer

La fonction exacte du peptide A β n'est pas connue. Produit à faible concentration en conditions physiologiques, il a longtemps été considéré comme étant un déchet métabolique. Cependant, Puzzo et collaborateurs ont montré qu'il aurait un rôle positif sur la plasticité synaptique, la neurotransmission et la mémoire dans une gamme de concentration proche du picomolaire (Puzzo et al., 2008).

Un déséquilibre entre la production (dans le sens d'une augmentation de la production) et l'élimination (en particulier *via* une diminution des différents processus de clairance détaillés dans le paragraphe précédent) du peptide A β va entraîner une accumulation d'A β dans le compartiment cérébral. Concernant les formes sporadiques de la MA, une étude a montré que la production du peptide A β est en réalité stable et que sa clairance est fortement diminuée chez ces patients par rapport à des contrôles sains (Mawuenyega et al., 2010). Les peptides A β ont une tendance naturelle à s'agréger pour former des oligomères solubles (majoritairement des tétramères), puis des fibrilles riches en feuillet bêta plissés et insolubles, qui vont ensuite précipiter pour donner les plaques séniles. Les plaques séniles se composent d'un cœur (ou noyau) amyloïde qui résulte de la précipitation des fibrilles et qui contient presque exclusivement de l'A β_{1-42} , et d'un « halo » composé principalement de neurites dystrophiques (Dickson and Vickers, 2001; Iwatsubo et al., 1994). D'autres substances ont également été retrouvées co-localisées avec les fibrilles dont, entre autres, des protéines sériques (albumine, immunoglobulines), des composants de la matrice extracellulaire (agrine, acétylcholinestérase), des lipides comme le cholestérol, des apolipoprotéines comme l'ApoE ou encore des ions métalliques (Atwood et al., 2002; Morgan et al., 2004). Responsable du transport du cholestérol, l'ApoE (et notamment l'ApoE E4, produit de l'allèle *APOE ε4*), est capable de se fixer fermement sur le peptide A β pour faciliter la formation des fibrilles (Ma et al., 1994; Wisniewski et al., 1994). Ainsi, l'ApoE est considéré comme un cofacteur de l'amyloïdogénèse. Le rôle du cholestérol et de l'ApoE dans le développement de la MA seront détaillés dans la partie I) **B.3. Les facteurs de risque**. La progression cérébrale de la pathologie amyloïde se fait par

étapes. Les plaques séniles se développent dans un premier temps dans le néocortex, puis touchent l'allocortex (contenant l'hippocampe), les ganglions de la base et le diencephale, l'hypothalamus et le mésencéphale et enfin le pont et le cervelet (Thal et al., 2008).

Les plaques séniles ont longtemps été désignées comme responsables de la neurotoxicité observée dans la MA. Cependant, il a été suggéré plus récemment que les oligomères d'A β soient les espèces réellement toxiques (Brouillette et al., 2012). Les plaques séniles agiraient alors comme un « réservoir » grâce auquel pourrait s'établir un équilibre entre fibrilles insolubles et oligomères d'A β toxiques (Jakob-Roetne and Jacobsen, 2009). Il a en effet été montré *in vitro* que les formes solubles du peptide A β induisent des dysfonctions mitochondriales et un stress oxydatif (Picone et al., 2014) ainsi que l'apoptose dose-dépendante des neurones (Pillot et al., 1999). De plus, des études *in vivo* utilisant les oligomères solubles d'A β provenant de cerveaux de patients atteints de la MA (Shankar et al., 2008) ou de modèles murins de MA (Lesné et al., 2006) ont montré que ceux-ci exerçaient un effet négatif sur la plasticité et la fonction synaptique (notamment par inhibition de la potentialisation à long terme) et sur la mémoire. Cette toxicité des formes oligomériques solubles d'A β expliquerait en partie l'origine des lésions neuronales observées chez un modèle murin de MA possédant une double mutation sur le gène humain de l'APP (India + Swedish mutation) et présentant une surproduction d'A β mais pas de plaques séniles (Hsia et al., 1999).

B.2.3. L'hypothèse de la cascade amyloïde

B.2.3.1. Cascade amyloïde ; notion de chronologie des lésions

Selon l'hypothèse amyloïde, le peptide A β est au cœur de la pathogénèse de la MA. La théorie de la cascade amyloïde a été développée sur la base de l'idée que l'accumulation cérébrale du peptide A β est l'évènement initial de la pathogénèse de la MA (Hardy and Higgins, 1992; Selkoe, 1991; Selkoe and Hardy, 2016; Yates and McLoughlin, 2008). En effet, le déséquilibre entre la production et l'élimination du peptide A β , dans le sens d'une augmentation des concentrations cérébrales d'A β , serait à l'origine de l'apparition en « cascade » de lésions pathologiques ; formation de plaques séniles, lésions vasculaires, neuroinflammation (activation de la microglie et des astrocytes), dégénérescence neurofibrillaire (NFTs), perte neuronale et synaptique, le tout aboutissant au déclin cognitif et à la démence (Selkoe and Hardy, 2016).

Peu de temps après, l'identification de mutations sur les gènes codant pour l'APP (*APP*) (Goate et al., 1991; Hardy, 1992; Mullan et al., 1992) puis sur les gènes codant pour les présénilines 1 et 2 (*PSEN1* et *PSEN2*) (Scheuner et al., 1996) dans des formes familiales de MA ont permis de conforter cette hypothèse amyloïde. Par la suite, le clonage de ces mutations a permis de confirmer qu'elles favorisent la voie amyloïdogénique du métabolisme de l'APP, provoquant une accumulation cérébrale de peptide A β (Bayer et al., 1996; Borchelt et al., 1996; Citron et al., 1992, 1997; Duff et al., 1996; Haass et al., 1994). Néanmoins, ces mutations ne concernent que les formes familiales de la MA, soit moins d'1% des cas.

Depuis, les progrès effectués dans la recherche sur la MA ont permis de mettre en évidence d'autres arguments en faveur de l'hypothèse d'une cascade amyloïde :

- les dépôts amyloïdes sont retrouvés de façon systématique dans les cerveaux de patients atteints de la MA,
- les individus présentant un syndrome de Down (une copie supplémentaire du chromosome 21, porteur du gène *APP*) ont un risque élevé de développer la MA. En cas de décès prématuré (au cours de l'adolescence), dû à une cause indépendante de la MA, ces individus présentent des plaques amyloïdes diffuses, mais sans neuroinflammation, dégénérescence neurofibrillaire ni dysfonctions synaptiques,
- des oligomères d'A β provenant de cerveaux de patients atteints de la MA ont montré une toxicité synaptique et une altération de la mémoire après injection intraventriculaire chez des rats sains, et une hyperphosphorylation de Tau dans des neurones de rats sains en culture,
- la perte synaptique est importante dans les régions riches en plaques séniles, et diminue de façon proportionnelle à la distance synapse/plaque
- en termes de biomarqueurs de la MA chez l'Homme, la détection des dépôts amyloïdes par tomographie par émission de positons précède de plusieurs années la détection des autres modifications (élévation de Tau dans le LCR, diminution du métabolisme cérébral du glucose, atrophie cérébrale, démence...) (Review: Selkoe and Hardy, 2016).

Tous ces arguments sont en faveur d'une pathologie amyloïde précoce, apparaissant en amont du stade symptomatique de la maladie et initiant les autres phénomènes pathologiques de la MA (dégénérescence neurofibrillaire, stress oxydatif, neuroinflammation, perte neuronale).

Enfin, la découverte de la neurotoxicité des formes solubles d'A β , comme nous l'avons évoquée précédemment, a entraîné une modification de l'hypothèse initiale de 1992. En effet, il est maintenant admis que les oligomères d'A β exercent une toxicité directe sur les synapses et les neurites, en plus de l'activation des microglies et des astrocytes (Selkoe and Hardy, 2016).

B.2.3.2. Limites de l'hypothèse amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde a cependant été remise en question, notamment parce qu'elle ne permet pas d'expliquer l'ensemble des phénomènes observés dans la MA (Herrup, 2015).

Tout d'abord, il a été montré que le degré d'altération cognitive que présente un patient atteint de la MA n'est que très peu corrélé avec l'étendue des plaques séniles (Villemagne et al., 2011). Les enchevêtrements neurofibrillaires, en revanche, montrent une meilleure corrélation (Nelson et al., 2012). Cela pourrait venir du fait que les dépôts amyloïdes apparaissent de façon très précoce dans la pathogénèse de la MA et que ce phénomène est distant de plusieurs années de l'apparition des manifestations cliniques. De plus, selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau induisant la formation des NFTs serait une conséquence de l'accumulation du peptide A β . Or, il existe de nombreuses tauopathies qui ne présentent aucune pathologie amyloïde (Ksiezak-Reding et al., 1994; Murayama et al., 1990; Suzuki et al., 1995; Wilhelmsen et al., 1994).

D'autre part, de nombreux agents thérapeutiques visant à diminuer la production ou l'agrégation du peptide A β , ou facilitant sa clairance, ont été développés mais se sont révélés inefficaces en clinique (Reitz, 2012). D'autres traitements d'immunisation anti-A β ont montré une diminution de la concentration cérébrale en peptide A β et/ou une disparition des plaques séniles, mais sans amélioration significative de la neurodégénérescence ou de la fonction cognitive des patients (Holmes et al., 2008; Salloway et al., 2014).

Enfin, l'augmentation de la production de peptide A β n'est pas suffisante pour expliquer son accumulation dans le cerveau des patients atteints de la MA. En effet, Mawuenyega et collaborateurs ont montré que l'accumulation du peptide A β serait liée à un défaut de son élimination, plutôt qu'à une augmentation de sa synthèse (Mawuenyega et al., 2010). Comme nous l'avons vu précédemment,

l'élimination du peptide A β cérébral passe en partie par son efflux au travers de la BHE. Ainsi, des chercheurs ont suggéré qu'une modification des propriétés fonctionnelles de la BHE pourrait être responsable du défaut de la clairance du peptide A β au travers de la BHE et de son accumulation cérébrale (Zlokovic, 2005).

Berislav Zlokovic a développé une hypothèse de la MA alternative à l'hypothèse de la cascade amyloïde, dite hypothèse « neurovasculaire » (Nelson et al., 2016; Zlokovic, 2005, 2011). Celle-ci s'oppose à l'idée que c'est l'accumulation du peptide A β qui est à l'origine des lésions neurovasculaires comme cela est suggéré dans l'hypothèse de la cascade amyloïde. Selon l'hypothèse neurovasculaire, les lésions de la microvasculature cérébrale, provenant de facteurs de risques vasculaires, génétiques ou environnementaux, seraient à l'origine de deux cascades pathologiques, l'une dépendante et l'autre indépendante du peptide A β , aboutissant aux lésions neuronales et synaptiques ainsi qu'aux troubles cognitifs observés dans la MA. Cette hypothèse est détaillée dans la partie II) C.4. [L'hypothèse neurovasculaire de la maladie d'Alzheimer.](#)

B.3. Les facteurs de risque

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'âge est le principal facteur de risque de la MA (voir partie I) B.1. [Définition, généralités et données épidémiologiques](#)). En revanche, le développement de la MA n'est pas un évènement systématique du vieillissement et un âge avancé n'est pas suffisant pour causer la maladie (den Dunnen et al., 2008). En effet, la MA est une pathologie complexe et multifactorielle pour laquelle de nombreux autres facteurs de risque ont été identifiés. Le sexe semble, par exemple, jouer un rôle important dans la survenue de la maladie, dans le sens d'une augmentation du risque chez les femmes (voir partie I) B.1. [Définition, généralités et données épidémiologiques](#)). Parmi les autres facteurs identifiés se trouvent les facteurs génétiques, pathologiques ou encore environnementaux (Alzheimer's Association, 2016).

B.3.1. Les facteurs génétiques et l'histoire familiale

B.3.1.1. Histoire familiale

Comme pour toute maladie chronique, il existe pour la MA une susceptibilité individuelle qui crée un terrain plus ou moins favorable à l'apparition de la maladie. Une histoire familiale de MA n'est pas nécessaire ni suffisante pour entraîner le développement de la maladie. Cependant, l'existence d'un cas de MA chez un proche du premier degré (parent, frère ou sœur) est en faveur de l'apparition de la

maladie chez un individu, avec une multiplication du risque par 1,5 environ (Green et al., 2002; Loy et al., 2014). Lorsque 2, ou plus, des proches ont développé la MA, le risque augmente considérablement ; il est multiplié par 2 environ (Lautenschlager et al., 1996). Cela peut s'expliquer d'une part par l'hérédité puisque de nombreux facteurs de risque génétiques de la MA ont été identifiés, mais aussi par l'environnement et le style de vie qui sont généralement partagés au sein d'une même famille (Alzheimer's Association, 2016).

B.3.1.2. Formes familiales de la maladie d'Alzheimer

La forme familiale de la maladie d'Alzheimer (FAD) ne touche que moins d'1% des patients. Elle se caractérise par une apparition précoce de la maladie (systématiquement avant 65 ans), et est d'origine purement génétique. Les mutations impliquées dans la FAD touchent 3 gènes : le gène codant pour le précurseur du peptide amyloïde (*APP*), situé sur le chromosome 21 et pour lequel 5 mutations du codon 717 sont actuellement connues, et les gènes codant pour les présénilines 1 et 2 (*PSEN1* et *PSEN2*) (**Tableau 1**). À ce jour, plus de 100 mutations différentes ont été identifiées pour le gène *PSEN1*. Celles-ci sont les plus fréquentes (environ 80% des cas familiaux connus) et conduisent à des formes très agressives de la maladie. Au contraire, les mutations du gène *PSEN2* sont extrêmement rares et associées à des formes moins agressives. Le point commun de ces trois gènes est qu'ils sont impliqués dans le processus amyloïdogénique. Leurs mutations respectives aboutissent à une augmentation de la synthèse d'A β ainsi qu'une augmentation du rapport A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀. La transmission se fait de façon autosomique dominante (Bekris et al., 2010; Goldman et al., 2011; www.fondation-alzheimer.org; www.molgen.u.ac.be).

B.3.1.3. Formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer

Dans le cas des formes sporadiques de la MA, c'est-à-dire non familiales, il existe des variants génétiques prédisposant au développement de la maladie (le plus connu d'entre eux, l'allèle *APOE* ϵ 4, est discuté dans le paragraphe suivant). Ces gènes de prédisposition ont été mis en évidence par des études d'association pangénomiques (*genome-wide association study*, GWAS), c'est-à-dire des études dont le but est d'identifier les gènes présentant un polymorphisme important, et notamment des SNPs (*single nucleotide polymorphism*), chez les patients atteints de la MA. De nombreuses études génomiques impliquant plusieurs milliers de patients et de témoins ont ainsi été réalisées dont notamment le consortium international IGAP (*international genomics of Alzheimer's project*), lancé en 2010. Ces études ont déjà permis d'identifier plus de 20 facteurs de susceptibilité génétique. Le niveau de susceptibilité

individuel dépend alors de la combinaison complexe de ces gènes (Lambert et al., 2013; www.fondation-alzheimer.org).

Ces gènes interviennent à différents niveaux de la physiopathologie de la MA. Ils peuvent être impliqués dans :

- le métabolisme amyloïde et lipidique comme *CLU* (*clusterin* ou *apolipoprotein J*) (Jun et al., 2010; Lambert et al., 2009; Seshadri et al., 2010), *ABCA7* (*ATP-binding cassette sub-family A transporter 7*) (Hollingworth et al., 2011), *SORL1* (*sortilin-related receptor 1*) (Lambert et al., 2013)...
- l'immunité innée et l'inflammation comme *CLU* (Jun et al., 2010; Lambert et al., 2009; Seshadri et al., 2010), *ABCA7* (Hollingworth et al., 2011), *CR1* (*complement component 3b/4b receptor 1*) (Harold et al., 2009; Jun et al., 2010; Lambert et al., 2009), *CD33* (*myeloid cell surface antigen*), *EPHA1* (*encoding ephrin receptor A1*) et *MS4A* (*membrane spanning 4A*) (Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011), *TREM2* (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) (Guerreiro et al., 2013), *HLA-DRB1/DRB5* (*class II histocompatibility antigen beta chain 1 and 5*) (Lambert et al., 2013)...
- le fonctionnement synaptique et l'organisation membranaire comme *BIN1* (*bridging integrator 1*) (Harold et al., 2009; Seshadri et al., 2010), *PICALM* (*phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein*) (Harold et al., 2009; Jun et al., 2010; Seshadri et al., 2010), *SORL1* (Lambert et al., 2013), *CD33*, *EPHA1* et *CD2AP* (*CD2-associated protein*) (Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011), *PTK2B* (*protein tyrosine kinase 2 beta*) et *SLC24A4/RIN3* (*solute carrier family 24 member 4/ Ras and Rab Interactor 3*) (Lambert et al., 2013)...

Enfin, pour d'autres, comme par exemple *DSG2* (*desmoglein-2*), le rôle dans la physiopathologie de la MA n'est pas encore élucidé (Karch et al., 2014; Lambert et al., 2013).

B.3.2. ApoE, cholestérol et maladie d'Alzheimer

B.3.2.1. L'allèle APOE ε4

L'allèle ε4 du gène *APOE* est le facteur génétique de prédisposition le plus important pour la MA de type sporadique. En effet, le lien entre MA et *APOE ε4* est connu depuis 1993 (Corder et al., 1993; Strittmatter et al., 1993) et des études ont estimées que 40 à 65% des patients atteints de la MA (hors formes

familiales) possèdent au minimum une copie de l'allèle *APOE* $\epsilon 4$ (Farrer et al., 1997; Saunders et al., 1993).

ApoE est l'apolipoprotéine majoritaire du SNC. Principalement synthétisée par les astrocytes, ApoE transporte les lipides et le cholestérol dans le SNC sous la forme de complexes ApoE-cholestérol-phospholipides. Ces complexes interagissent avec les récepteurs de la famille des LDLR (*low density lipoprotein receptor*) comme par exemple LRP1 (*low-density lipoprotein receptor related protein 1*) qui est largement exprimé dans le SNC, en particulier à la surface des neurones et des astrocytes. Au niveau du SNC, ApoE est impliqué dans l'homéostasie cérébrale du cholestérol, la distribution des lipides, la croissance des gaines de myéline et la protection des axones (Bales, 2010; Bu, 2009; Leduc et al., 2010; Mahley, 1988).

Le gène codant pour l'ApoE (*APOE*) est situé sur le chromosome 19q13.2 et possède trois allèles, notées $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$, qui diffèrent les uns des autres par un seul acide aminé. La combinaison de ces trois allèles aboutit à 6 génotypes différents : $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ et $\epsilon 4/\epsilon 4$. L'allèle $\epsilon 3$ est le plus commun ; sa fréquence dans la population caucasienne est de 77%. A l'inverse, l'allèle $\epsilon 2$ est le moins commun avec une fréquence de seulement 8 % (Bu, 2009; Mahley, 1988).

Les individus possédant une copie de l'allèle $\epsilon 4$ présentent un risque 3 à 4 fois plus élevé de développer la MA que ceux n'en possédant aucun. Les individus possédant deux copies de l'allèle $\epsilon 4$ ont, quant à eux, un risque 8 à 12 fois plus élevé de développer la MA (Corder et al., 1993; Loy et al., 2014; Saunders et al., 1993). De plus, l'*APOE* $\epsilon 4$ est associé à une apparition plus précoce de la maladie (Spinney, 2014). Cependant, posséder l'allèle *APOE* $\epsilon 4$ ne signifie pas systématiquement que l'individu va développer la MA. De même, l'absence de celui-ci n'est pas une garantie de ne jamais développer la MA (Henderson et al., 1995). Il est intéressant de noter que l'allèle *APOE* $\epsilon 4$ a aussi été identifié comme facteur de risque de l'angiopathie amyloïde cérébrale, des tauopathies, des démences à corps de Lewy ou encore de la maladie de Parkinson (Bu, 2009). Ces observations suggèrent que ApoE E4 pourrait contribuer par divers mécanismes au déclin cognitif et à la neurodégénérescence (Bu, 2009; Mahley and Huang, 2006). Enfin, posséder au moins une copie de l'allèle $\epsilon 2$ serait plutôt protecteur vis-à-vis de la MA (Iacono et al., 2015).

Même si les mécanismes moléculaires reliant l'isoforme ApoE E4 à la MA ne sont pas entièrement élucidés à ce jour, il a toutefois été montré que celui-ci est associé à une augmentation de la production du peptide A β , un défaut de son élimination ainsi qu'à une augmentation des dépôts amyloïdes (Beffert

et al., 1999; Ye et al., 2005). La production accrue du peptide A β pourrait s'expliquer par une augmentation de la ré-internalisation et du recyclage de l'APP en présence d'ApoE E4 (Ye et al., 2005). De plus, il a également été montré que l'isoforme ApoE E4 favorisait l'agrégation et la formation des plaques séniles par fixation au peptide A β (Ma et al., 1994; Wisniewski et al., 1994). Enfin, les individus homozygotes $\epsilon 4/\epsilon 4$ présenteraient un niveau d'expression plus faible d'ApoE dans le SNC, ce qui jouerait en défaveur d'une homéostasie lipidique cérébrale, du remodelage des membranes cellulaires et de la plasticité neuronale (Arendt et al., 1997; Poirier, 2005).

B.3.2.2. Le cholestérol

Le cholestérol cérébral représente 25% du cholestérol total chez l'Homme adulte. Il entre notamment dans la composition de la gaine de myéline, formée par les oligodendrocytes, et de la membrane plasmique des neurones et des cellules gliales (Dietschy and Turley, 2001; Saher et al., 2005). Le cholestérol joue un rôle primordial dans le bon fonctionnement neuronal et la plasticité synaptique. Il a été montré qu'une perturbation de l'homéostasie et du transport du cholestérol cérébral pourrait contribuer au processus neurodégénératif dans de nombreuses pathologies, en particulier dans la MA (Sjögren and Blennow, 2005).

En conditions physiologiques, le cholestérol nécessaire au fonctionnement des organes provient soit de la capture du cholestérol circulant, soit de sa synthèse *de novo*. Dans le cas particulier du cerveau, la quasi-totalité du cholestérol cérébral est synthétisé *de novo* (Dietschy and Turley, 2001). En effet, la capture du cholestérol périphérique, lorsqu'il est lié aux lipoprotéines plasmatiques de grande taille ; LDL (*low density lipoproteins*) et VLDL (*very low density lipoproteins*), est fortement limitée par la BHE. Une faible quantité de cholestérol peut cependant traverser la BHE associé à des lipoprotéines de plus petite taille ; les HDL (*high density lipoproteins*) (Candela et al., 2008; Di Paolo and Kim, 2011). La synthèse du cholestérol cérébral se fait principalement dans les astrocytes et les oligodendrocytes à l'âge adulte. Il sera par la suite transporté jusqu'aux neurones sous la forme de particules sphériques composées d'ApoE et de phospholipides et dont la taille est proche des HDL (Björkhem and Meaney, 2004). Après incorporation dans les neurones, le cholestérol peut être redistribué au sein des membranes lors notamment des remodelages synaptiques et dendritiques, ou bien stocké sous forme estérifiée (insoluble dans l'eau) grâce à l'intervention d'une enzyme ; l'ACAT (*acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase*) (Pfriege, 2003; Poirier, 2005; Shobab et al., 2005).

L'hypothèse d'un lien entre cholestérol et MA est suggérée dès 1993 lorsque l'allèle *APOE ε4* est identifié comme facteur génétique de prédisposition pour la MA (Corder et al., 1993; Di Paolo and Kim, 2011; Strittmatter et al., 1993). Cependant, les mécanismes reliant métabolisme cérébral du cholestérol et lésions physiopathologiques de la MA ne sont pas encore complètement élucidés, probablement car ceux-ci sont complexes et variés (Chang et al., 2017).

Il a été montré que le cholestérol (tout comme l'ApoE E4) favorise l'agrégation du peptide Aβ et la formation des plaques séniles (Mizuno et al., 1999; Schneider et al., 2006). Cette propriété du cholestérol a été confirmée par l'étude *post-mortem* de cerveaux de patients atteints de la MA et pour lesquels il a été observé une accumulation de cholestérol au niveau des plaques séniles (Panchal et al., 2010). D'autre part, une étude réalisée chez le lapin ayant reçu un régime riche en cholestérol a montré que celui-ci favorisait également la phosphorylation de la protéine Tau (Ghribi et al., 2006). Enfin, il a été montré que le métabolisme de l'APP serait directement dépendant de la teneur en cholestérol dans les membranes cellulaires. En effet, certaines protéines transmembranaires, comme les γ- et β-sécrétases, ont une activité significativement augmentée dans un environnement riche en cholestérol (Ehehalt et al., 2003; Wolozin, 2004). Ainsi, une concentration élevée de cholestérol membranaire joue en faveur de la voie amyloïdogénique de métabolisme de l'APP et favorise la production d'Aβ (Ehehalt et al., 2003; Xiong et al., 2008). À l'inverse, les traitements hypocholestérolémiant favorisent l'activité de l'α-sécrétase, et donc la voie non-amyloïdogénique du métabolisme de l'APP (Grimm et al., 2008; Kojro et al., 2001). Les résultats de ces études indiquent qu'au niveau du SNC, l'augmentation des concentrations de cholestérol cellulaire serait responsable d'une augmentation de la production et de l'accumulation du peptide Aβ, contribuant ainsi à la physiopathologie de la MA. D'autres études proposent cependant une hypothèse différente, suggérant qu'une déplétion importante en cholestérol membranaire pourrait entraîner des altérations structurales et fonctionnelles des membranes et favoriser la vulnérabilité des neurones vis-à-vis de la toxicité des oligomères d'Aβ (Koudinov and Koudinova, 2005; Sponne et al., 2004).

D'un point de vue épidémiologique, les résultats des études explorant le lien entre cholestérol et MA sont aussi très divergents. L'hétérogénéité de ces résultats pourrait s'expliquer par le fait que la relation entre les concentrations de cholestérol plasmatique et la prévalence de la MA varie en fonction de l'âge (Mielke et al., 2005; Sjögren and Blennow, 2005), comme cela avait été observé pour les maladies cardiovasculaires par exemple (Klag et al., 1993; Kronmal et al., 1993). En effet, des concentrations élevées de cholestérol plasmatique aux alentours de 50 ans (« *mid-life* ») seraient liés à une augmentation du risque d'apparition de la MA à long terme (Kivipelto et al., 2001; Notkola et al., 1998). Allant dans le

même sens, d'autres études ont montré que l'utilisation de traitements hypocholestérolémiants, comme les statines, réduirait la prévalence de la MA (Haag et al., 2009; Rockwood et al., 2002; Wolozin and Behl, 2000b). En revanche, une concentration élevée de cholestérol plasmatique serait plutôt protecteur vis-à-vis de la MA chez les sujets plus âgés, c'est-à-dire après 70 ans (« *late life* ») (Mielke et al., 2005; Romas et al., 1999). Il est intéressant de noter que des résultats similaires ont été obtenus *in vivo*. En effet, il a été montré qu'un régime riche en cholestérol provoquait une altération de la perfusion cérébrale, une augmentation de l'accumulation cérébrale d'A β ainsi qu'une perte synaptique importante chez plusieurs modèles murins de MA (Hooijmans et al., 2007a; Shie et al., 2002; Umeda et al., 2012) et que l'administration d'hypocholestérolémiants chez ces souris permettait, entre autres, de réduire l'accumulation cérébrale d'A β (Kurata et al., 2011; Refolo et al., 2001). Cependant, les variations des concentrations de cholestérol circulant ne peuvent être directement mises en relation avec les modifications observées dans le cerveau puisque nous avons vu précédemment que la BHE limitait fortement les échanges de cholestérol entre le sang et le cerveau. C'est pourquoi la recherche s'intéresse à deux oxystérols ; le 24S-hydroxy-cholestérol (24S-OH-chol) et le 27-hydroxy-cholestérol (27-OH-chol), deux métabolites du cholestérol qui traversent facilement la BHE, et dont les concentrations suivent étroitement celles du cholestérol circulant (Björkhem et al., 2006).

Le 24S-OH-chol est produit par les neurones et rejoint la circulation sanguine par passage au travers de la BHE suivant son gradient de concentration, probablement en empruntant un transporteur de la famille des OATPs (*organic anion transporting polypeptides*) (Ohtsuki et al., 2007), pour être ensuite éliminé par le foie, participant ainsi au renouvellement du cholestérol cérébral (Leoni and Caccia, 2013; Lütjohann et al., 1996; Pfrieger, 2003). Le 27-OH-chol est, quant à lui, produit en périphérie et peut rejoindre le cerveau, à priori par diffusion au travers de la BHE (Björkhem, 2006; Leoni et al., 2003). Des études ont montré que le 27-OH-chol était capable d'induire l'expression de BACE1 et la production d'A β et que les concentrations cérébrales de 27-OH-chol étaient élevées dans la MA (Dasari et al., 2010; Marwarha et al., 2010; Prasanthi et al., 2009; Sharma et al., 2008). D'autre part, le 24S-OH-chol et le 27-OH-chol sont des agonistes des récepteurs des oxystérols (*liver X receptors*, LXR), récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation de l'homéostasie cellulaire du cholestérol (Vaya and Schipper, 2007; Whitney et al., 2002). Des études ont montré que l'activation des LXR par leurs agonistes entraîne une augmentation de l'expression des gènes codant pour les transporteurs ABCA1 (Burns et al., 2006; Fitz et al., 2010; Saint-Pol et al., 2013; Terwel et al., 2011; Wang et al., 2002) et ABCB1 (P-gp) (Saint-Pol et al., 2013), tous deux suspectés de participer à l'efflux cérébral du peptide A β et/ou à la restriction de son influx (voir partie II)

B.2.3. Transport médié par les ATP-binding carriers (ABC)). Le 24S-OH-chol et le 27-OH-chol seraient donc indirectement impliqués dans le mécanisme de clairance cérébrale du peptide A β par la BHE. Ces résultats suggèrent que le 24S-OH-chol et le 27-OH-chol pourraient être les éléments reliant cholestérol périphérique et MA, *via* BACE1 et les récepteurs d'efflux des stérols (ABCA1 et potentiellement ABCB1).

En conclusion, les études *in vitro*, *in vivo* et épidémiologiques suggèrent que l'altération de l'homéostasie cérébrale du cholestérol occupe une place importante dans la pathogénèse de la MA. Cependant, les mécanismes par lesquels le cholestérol contribue aux lésions caractéristiques de la maladie ne sont pas encore précisément connus.

B.3.3. Les facteurs cérébrovasculaires

Chaque aire cérébrale du cerveau possède une fonction déterminée et est vascularisée par une artère spécifique (voir partie II) **A.2. Vascularisation du cerveau**). Ainsi, toute perturbation de la vascularisation d'une région va causer une perte de la fonction neurologique qui se trouve sous le contrôle de celle-ci. De plus, il a été montré qu'une perturbation du système vasculaire cérébral serait un facteur de risque pour le développement de la MA (O'Brien and Markus, 2014; Pendlebury et al., 2011; Reitz et al., 2011).

Le cas de l'accident vasculaire cérébral (AVC) a été particulièrement bien étudié. En effet, les AVC représentent le premier facteur de risque vasculaire de la MA (Honig et al., 2003; de la Torre, 2006). Lors d'un AVC, le débit sanguin cérébral est brusquement interrompu, soit par un blocage d'une artère cérébrale (il s'agit des accidents ischémiques qui représentent 80% des AVC), soit par rupture d'un vaisseau ou d'une artère (il s'agit des accidents hémorragiques qui représentent 20% des AVC). Dans les deux cas, l'interruption de la vascularisation entraîne l'apparition de lésions cérébrales, et possiblement une perte neuronale. Si la zone touchée est liée aux fonctions de mémorisation et d'apprentissage, l'AVC sera à l'origine d'un déficit cognitif (Cumming and Brodtmann, 2011). De plus, l'hypoperfusion liée à l'AVC va également induire des modifications fonctionnelles et une réaction inflammatoire qui vont favoriser le développement de la MA (Pendlebury et al., 2011). Enfin, il a été montré qu'il existait une augmentation des dépôts amyloïdes chez les patients ayant subi un AVC (Ly et al., 2010).

D'autre part, certaines pathologies cardiaques associées à une hypoperfusion cérébrale comme par exemple l'insuffisance cardiaque (Polidori et al., 2006; Qiu et al., 2006) ou la fibrillation auriculaire (Ott et al., 1997) sont également associées à un risque plus élevé de développer la MA. Comme dans le cas des

AVC, la diminution du débit sanguin cérébral entraîne des altérations fonctionnelles pouvant se traduire par une détérioration des fonctions cognitives (Austin et al., 2011; de Toledo Ferraz Alves et al., 2010).

Enfin, il a été montré que l'hypertension artérielle pouvait elle aussi constituer un facteur de risque de la MA (Reitz et al., 2011; Shah et al., 2012). Des études ont montré que les traitements antihypertenseurs permettraient de réduire l'incidence de la MA chez les patients hypertendus (Forette et al., 1998), ou de retarder son apparition, notamment *via* une action neuroprotectrice et anti-inflammatoire, dans des modèles murins de MA (Danielyan et al., 2010; Mogi et al., 2008).

B.3.4. Les facteurs liés au mode de vie

Plusieurs facteurs de risque modifiables de la MA, c'est-à-dire des facteurs de risque liés au mode de vie et sur lesquels nous avons une influence, ont été identifiés. Ceux-ci incluent les facteurs de risque cardiovasculaires non ou insuffisamment pris en charge (notamment le diabète, l'obésité l'hypertension artérielle et l'hyperlipidémie), la sédentarité, les microtraumatismes crâniens (pouvant être constatés chez certains sportifs comme par exemple les joueurs de football américain ou les boxeurs), les anesthésies répétées ou encore le tabac (www.inserm.fr). Au contraire, une activité professionnelle stimulante ainsi qu'une vie sociale active pourraient retarder sensiblement l'apparition des symptômes mais aussi limiter leur sévérité (Alzheimer's Association, 2016; Arab and Sabbagh, 2010). Enfin, la consommation de caféine semble être associée à un risque plus faible d'apparition de la MA (van Gelder et al., 2007; Ritchie et al., 2007).

Deux études prospectives réalisées sur une population large ont récemment rapporté qu'une activité physique régulière, une prise en charge adaptée des principaux risques cardiovasculaires, une alimentation équilibrée ainsi qu'une stimulation cognitive tout au long de la vie permettraient de réduire significativement les risques de survenue d'un déclin cognitif et d'une démence (Baumgart et al., 2015; Committee on the Public Health Dimensions of Cognitive Aging et al., 2015).

B.4. Approches thérapeutiques

B.4.1. Bilan des stratégies thérapeutiques existantes en clinique

Deux types de traitements sont actuellement disponibles sur le marché pour la prise en charge de la MA :

- un antagoniste voltage-dépendant non compétitif des récepteurs NMDA (récepteurs du glutamate), la Mémantine, qui permet de diminuer l'excitotoxicité,
- les inhibiteurs d'acétylcholinestérase (*acetylcholinesterase inhibitor*, AChEI) : Donepezil, Galantamine et Rivastigmine, qui permettent de renforcer la voie de signalisation cholinergique.

Malheureusement, l'impact de ces molécules sur la maladie est à la fois modeste et transitoire (Huang and Mucke, 2012). Ces traitements permettent de soulager certains des symptômes de la pathologie mais ne sont pas curatifs ; ils ne peuvent ni prévenir, ni arrêter ou inverser l'évolution de la maladie (Hung and Fu, 2017; www.francealzheimer.org).

Suite aux bons résultats obtenus *in vivo* (Morgan et al., 2000; Schenk et al., 1999; Sigurdsson et al., 2001), la stratégie vaccinale anti-A β a été explorée (Wisniewski and Drummond, 2016). Les groupes Elan Pharmaceuticals et Wyeth Corporation sont les premiers à tester en 2000 une immunothérapie anti-A β active chez l'Homme (vaccin AN 1792) (Bayer et al., 2005). Malheureusement, la phase II est arrêtée en 2002 après l'apparition de cas de méningo-encéphalites chez environ 6% des patients immunisés (Robinson et al., 2004). Depuis ce premier essai thérapeutique, 5 immunothérapies anti-A β de deuxième génération sont entrées en phases cliniques (Lemere and Masliah, 2010; Wisniewski and Drummond, 2016) mais une seule d'entre elles est aujourd'hui encore en développement dans la MA, il s'agit du vaccin CAD106 (www.clinicaltrials.gov). Celui-ci est conçu pour stimuler la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre un fragment peptidique d'A β (peptide A β_{1-6}) tout en évitant l'activation des cellules T inflammatoires. Pour induire la réponse immunitaire, le peptide est couplé à une protéine d'enveloppe du bactériophage Q β (Wiessner et al., 2011; Winblad et al., 2012). Les résultats obtenus en phase II pour ce vaccin sont encourageants (Vandenberghe et al., 2017).

Depuis 2003, aucun nouveau traitement n'a été mis sur le marché dans l'indication MA, mais de nombreuses molécules sont actuellement en phases cliniques d'évaluation. Le tableau ci-dessous présente les thérapies actuellement évaluées en clinique pour le traitement de la MA, classées en fonction de la lésion neuropathologique caractéristique de la MA ciblée (**Tableau 2**) :

Lésion neuropathologique caractéristique de la MA ciblée	Stratégie	Mécanisme d'action	Nom (Laboratoire)	Type de thérapie	Phase clinique en cours
Déficit de la voie de signalisation cholinergique	Augmentation de la réponse cholinergique	Antagoniste sérotoninergique (antagoniste du récepteur 5-HT ₆)	Intepirdine (Axovant Sciences Ltd.)	Petite molécule	II/III
		Antagoniste histaminique (antagoniste du récepteur H ₃)	SUVN-G3031 (Suven Life Sciences Ltd.)	Petite molécule	I
Hyperactivité glutamatergique	Inhibition de l'excitotoxicité glutamatergique	Inhibiteur de la libération présynaptique de glutamate	Riluzole (Sanofi)	Petite molécule	II
Plaques séniles	Inhibition de la production d'Aβ	Inhibiteurs de BACE	E2609 (Biogen, Eisai Co., Ltd.)	Petite molécule	III
			AZD3293 (AstraZeneca, Eli Lilly & Co.)	Petite molécule	III
			CNP520 (Amgen, Inc., Novartis Pharmaceuticals Corporation)	Petite molécule	II/III
			JNJ-54861911 (Janssen, Shionogi Parma)	Petite molécule	II/III
			Verubecestat (Merck)	Petite molécule	III
		Modulateur de la β-sécrétase	NIC5-15 (Humanetics Pharm. Corporation)	Petite molécule	II
	Augmentation de la clairance d'Aβ	Immunothérapie anti-Aβ active	CAD106 (Novartis Pharmaceuticals Corporation)	Peptide Aβ ₁₋₆	II/III
		Immunothérapie anti-Aβ passive	AAB-003 (Janssen, Pfizer)	Anticorps monoclonal	I
			Crenezumab (AC Immune SA, Genentech, Hoffmann-La Roche)	Anticorps monoclonal	III
			Gantenerumab (Chugai Pharmaceuticals Co., Ltd., Hoffmann-La Roche)	Anticorps monoclonal	III
			BAN2401 (Biogen, Eisai Co., Ltd.)	Anticorps monoclonal	II
			Aducanumab (Biogen)	Anticorps monoclonal	III
Enchevêtrements neurofibrillaires	Stabilisation des microtubules	Stabilisateur de microtubules	TPI 287 (Cortice Biosciences)	Petite molécule	I
	Prévention de l'agrégation de Tau	Inhibiteur de l'agrégation de Tau	TRx0237 (TauRx Therapeutics Ltd.)	Petite molécule	III

	Prévention de la phosphorylation de Tau	Activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase)	Metformine (Antidiabétique oral, sur le marché en France depuis 1957)	Petite molécule	NA
	Augmentation de la clairance de la protéine Tau hyper-phosphorylée	Immunothérapie anti-Tau phosphorylée active	AADvac-1 (Axon Neuroscience SE)	Peptide synthétique correspondant à une version tronquée de Tau	II
			ACI-35 (AC immune SA, Janssen)	Protéine Tau humaine synthétique phosphorylée	I
Neuroinflammation	Diminution de la neuro-inflammation	Inhibiteurs de l'activation microgliale	Azeliragon (Pfizer, TransTech Pharma, Inc., vTv Therapeutics LLC)	Petite molécule	III
			CHF 5074 (Cerespir™ Inc., Chiesi Pharmaceuticals Inc.)	Petite molécule	II

Tableau 2 : Classification des différentes stratégies thérapeutiques actuellement en cours d'évaluation clinique dans la maladie d'Alzheimer (Hung and Fu, 2017; Koenig et al., 2017; Kumar et al., 2015; Sala Frigerio and De Strooper, 2016; www.clinicaltrials.gov).

B.4.2. La stratégie anti-PKR

La molécule que nous avons étudiée au cours de cette thèse a un mécanisme d'action différent des molécules actuellement en cours d'évaluation clinique et présentées dans le paragraphe précédent. Il s'agit d'une petite molécule ayant été développée par le laboratoire Sanofi, dont nous ferons référence sous le nom de PKRinh pour « *PKR inhibitor* ».

PKR (*double-stranded RNA-dependent protein kinase*) est une protéine kinase pouvant être activée par l'ARN double brin, c'est-à-dire l'ARN viral. PKR est exprimée de manière ubiquitaire et joue un rôle important dans la défense de l'organisme contre les infections virales (Patel et al., 2000). Elle appartient à une famille de 4 sérine/thréonine kinases impliquées dans l'activation de la sous-unité α du facteur d'initiation eucaryote 2 (*eukaryotic protein synthesis initiation factor 2*, eIF2). Les trois autres kinases de cette famille sont :

- GCN2 (*general control non-derepressible-2*), exprimée dans le foie et le cerveau ; elle est impliquée dans le contrôle de la synthèse des acides aminés (Dever and Hinnebusch, 2005; Guo and Cavener, 2007),

- PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*), localisée dans le réticulum endoplasmique et principalement exprimée dans le pancréas ; elle est notamment impliquée dans la régulation de l'homéostasie glucidique (Gao et al., 2012; Koumenis et al., 2002),
- HRI (*heme-regulated inhibitor kinase*), exprimée dans les réticulocytes, dont la principale fonction est de coordonner la synthèse de l'hémoglobine en fonction de la disponibilité en hème (Han et al., 2001).

Toutes ces kinases sont activées dans différentes conditions de stress cellulaire : une privation en acides aminés pour GCN2, un stress du réticulum endoplasmique ou une hypoxie pour PERK, l'ARN double brin viral, le peptide A β , les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , ou un stress du réticulum endoplasmique pour PKR et enfin de faibles concentrations en hème pour HRI (Kaufman, 1999) (**Figure 7**). Une fois activées, ces kinases sont capables d'activer eIF2 par phosphorylation d'une sérine de sa sous-unité α .

EIF2 est un facteur d'initiation nécessaire pour la traduction de l'ARN messager (ARNm) dans le processus de synthèse protéique. La voie de synthèse protéique médiée par eIF2 joue notamment un rôle primordial dans la plasticité synaptique et le développement de la mémoire à long-terme. Dans le cerveau, la phosphorylation de eIF2 par PKR se traduit par une inhibition de la synthèse protéique et une apoptose des neurones (Chang et al., 2002; Peel and Bredesen, 2003; Ruvolo, 2001). C'est pourquoi PKR est considérée comme étant une kinase pro-apoptotique. De plus, PKR est également capable d'activer le facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), via le complexe IKK (I κ B kinase), qui va alors induire une réponse de type pro-inflammatoire (Bonnet et al., 2000) (**Figure 7**).

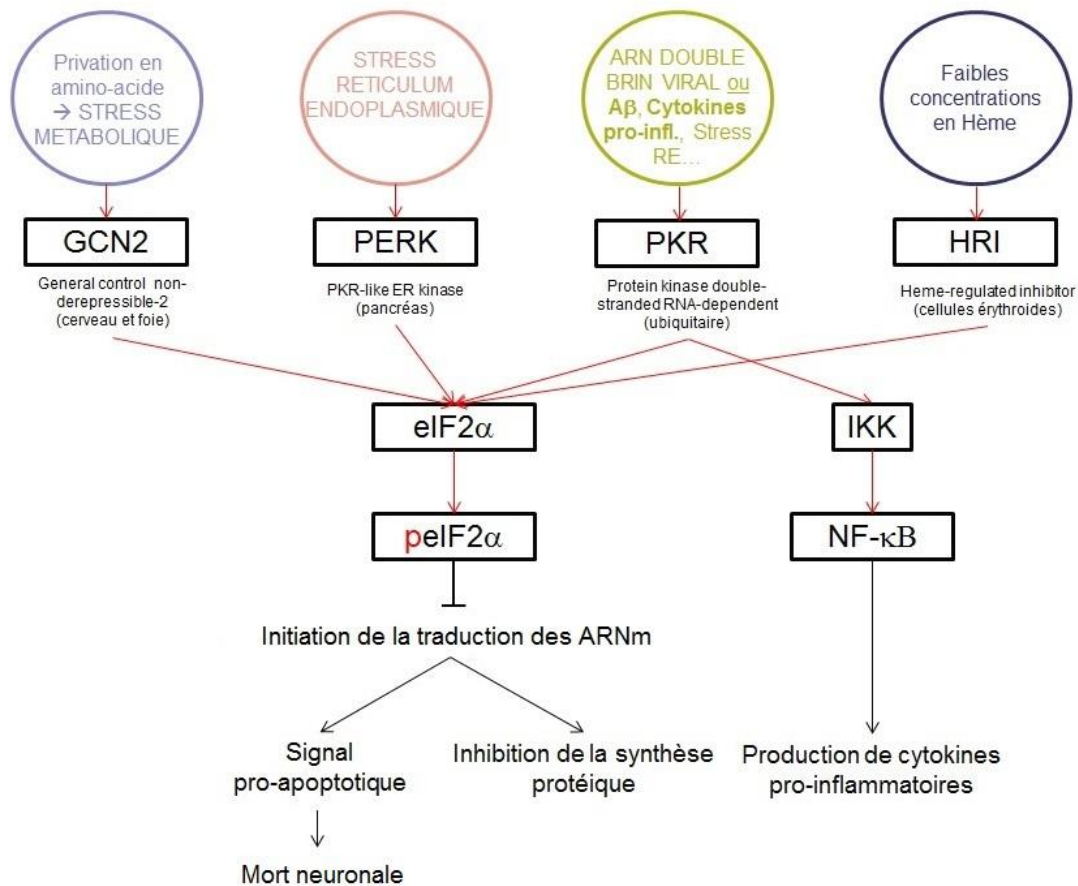


Figure 1: Implication de PKR dans les voies eIF2 α et NF- κ B. Dans le cerveau, l'activation de PKR produit une neurodégénérescence (signal pro-apoptotique), a un effet néfaste sur la cognition (inhibition de la synthèse protéique) et une neuroinflammation (voie du NF- κ B), ce qui explique l'intérêt d'une inhibition de l'activation de PKR pour le traitement des maladies neurodégénératives.

Une augmentation de PKR et de pPKR (PKR phosphorylé ; la forme activée de PKR), a été retrouvée dans le LCR de patients atteints de la MA (Mouton-Liger et al., 2012a). De plus, il a été montré que les niveaux de pPKR dans le LCR étaient corrélés à la gravité du déclin cognitif des patients étudiés (Dumurgier et al., 2013; Paquet et al., 2015). Enfin, PKR serait également capable de moduler la synthèse de BACE1 (Mouton-Liger et al., 2012b) ainsi que la phosphorylation de Tau en réponse à une exposition au peptide A β (Bose et al., 2011). Ainsi, l'inhibition de PKR est une cible très intéressante pour le traitement des maladies neurodégénératives, en particulier la MA.

PKRinh, un inhibiteur sélectif de l'activation de PKR, a déjà montré des résultats prometteurs *in vivo*. Mouton-Liger et collaborateurs ont montré une réduction de la phosphorylation de eIF2 α , de la perte neuronale et de la synthèse de BACE1, accompagnée d'une diminution de la production d'A β , dans un modèle murin de neurodégénérescence induite par une carence en thiamine (*thiamine deficiency (TD)*)

model) (Mouton-Liger et al., 2015). Cependant, la pharmacocinétique cérébrale ainsi que les mécanismes de passage de la BHE de PKRinh ne sont pas connus. Ceux-ci font l'objet de notre deuxième article ([Article 2](#)).

C. Les modèles murins utilisés dans la maladie d'Alzheimer

C.1. Intérêt des modèles murins

Les modèles animaux ont pour objectif de reproduire les symptômes, les lésions et, idéalement, les causes d'une pathologie. Dans le cas de la MA, de nombreux modèles murins ont été développés dans le but de mieux comprendre l'origine des symptômes, la cinétique d'apparition des changements observés mais aussi pour l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi les différentes espèces animales pouvant être utilisées, les modèles murins ont de loin été les plus utilisés dans la MA. En effet, des études ont montré qu'il existait une conservation phylogénétique entre l'Homme et la souris par exemple dans les mécanismes moléculaires impliqués dans le vieillissement cérébral (Oh et al., 2011), ou encore dans la structure et la fonction des circuits intervenant dans la mémoire épisodique, particulièrement vulnérable dans la MA (Hall and Roberson, 2012). De plus, l'Homme et la souris possèdent le même nombre de gènes codant pour des protéines ainsi qu'une syntonie importante, c'est-à-dire une conservation à hauteur de 90% de l'ordre des gènes sur les chromosomes entre ces deux espèces (Mouse Genome Sequencing Consortium et al., 2002). Un autre avantage de la souris est qu'il s'agit d'une espèce permettant de réaliser des manipulations génétiques relativement facilement. Enfin, les modèles murins offrent un système d'étude suffisamment réducteur par rapport aux autres espèces couramment utilisées en expérimentation animale pour permettre d'en faciliter l'hébergement, la manipulation et l'expérimentation.

Il faut cependant souligner que les modèles murins ne sont pas parfaits puisqu'ils reproduisent systématiquement la pathologie de façon incomplète. De plus, certains composés qui semblaient très prometteurs lors d'essais précliniques chez la souris ont par la suite donné lieu à des essais cliniques infructueux, du fait notamment de différences d'ordre pharmacocinétique (Geerts, 2009).

La souris reste néanmoins l'animal de choix pour modéliser la MA et nous allons détailler ci-dessous les principaux modèles murins ayant été développés.

C.2. Modèles non transgéniques

C.2.1. Modèles spontanés

Les rongeurs, contrairement à certains autres animaux de laboratoire comme les primates (Gearing et al., 1997; Price et al., 1991) ou les chiens (Colle M-A et al., 2000; Cummings et al., 1996), ne développent pas, de façon spontanée avec l'âge, de lésions caractéristiques de la MA (Van Dam and De Deyn, 2006). Ainsi, les souris ne peuvent pas être utilisées comme modèle « naturel » de la maladie de type sporadique (Pallas et al., 2008). Il est important de noter que du fait de leur durée de vie et coût d'hébergement élevés, les primates et les chiens ne constituent pas pour autant de meilleurs modèles animaux de la MA pour un usage commun (Woodruff-Pak, 2008).

Les souris âgées peuvent cependant aider à la compréhension des mécanismes neuronaux impliqués dans le vieillissement cérébral « normal » (Van Dam and De Deyn, 2006). Un modèle murin de vieillissement accéléré (souris SAM, *senescence accelerated mouse*) a été développé par sélection phénotypique à partir d'un pool de souris ARK/J (Takeda et al., 1981). Parmi les 9 sous-souches SAMP (*SAM-prone*) générées, les souris SAMP8 présentent un déficit âge-dépendant de la mémoire et de l'apprentissage ainsi que des altérations de l'expression de gènes et de protéines liées aux mécanismes neuroprotecteurs, à la transduction de signaux, au repliement et à la dégradation de protéines, au métabolisme énergétique, à la réponse immunitaire et au transport axonal. Ainsi, le modèle SAMP8 est un bon modèle murin pour l'étude des mécanismes fondamentaux des troubles liés au vieillissement normal, par opposition au vieillissement pathologique (Butterfield and Poon, 2005; Van Dam and De Deyn, 2006).

C.2.2. Modèles de déficit cholinergique et de perfusion cérébrale d'A β

Plusieurs stratégies d'inhibition de la voie de signalisation cholinergique ont été développées car il a été montré qu'une déficience fonctionnelle de la voie cholinergique est impliquée dans la physiopathologie de la MA (Barrantes et al., 2010). La perturbation de la neurotransmission cholinergique peut être induite pharmacologiquement, par injection de scopolamine ou d'atropine (antagonistes des récepteurs muscariniques) produisant principalement une altération de la mémoire (Dodart and May, 2005; Ebert and Kirch, 1998), ou par lésion chimique (par injection de neurotoxines), mécanique (méthode chirurgicale) ou électrique (Gray and McNaughton, 1983; Sloan et al., 2006; Toledano and Alvarez, 2004).

Cependant, l'hypofonction cholinergique n'est pas associée à l'apparition des lésions caractéristiques de la MA.

La perfusion intra-cérébrale ou intra-cérébroventriculaire, aigüe ou chronique, de peptide A β (Ab1-40 ou Ab1-42) chez le rongeur permet de reproduire certains des symptômes de la MA comme des déficits cognitifs, des altérations du comportement et de la fonction cholinergique (Harkany et al., 1998; Nag et al., 1999; Nakamura et al., 2001; Olariu et al., 2002; Stéphan et al., 2001), ou bien d'accélérer le processus pathologique dans un modèle transgénique de MA (Götz et al., 2001), mais n'induit pas directement l'apparition des lésions de type plaques séniles ou NFTs (Games et al., 1992; Van Dam and De Deyn, 2006). De plus, ces modèles peuvent présenter une grande variabilité inter-laboratoire en fonction notamment du site ou de la durée d'injection, mais aussi en raison des différences de longueur et de concentration de peptide A β ayant été perfusées.

Les modèles mimant un déficit cholinergique ainsi que les modèles de perfusion cérébrale de peptide A β présentés ci-dessus ne permettent pas de reproduire les lésions caractéristiques de la MA ; ils ne reproduisent que des symptômes similaires à ceux observés dans la MA, mais dont la cause peut être différente. Ces modèles sont en particulier mal adaptés à la recherche et l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques. La révolution dans ce domaine est venue de la création de modèles murins transgéniques (Duyckaerts et al., 2008).

C.3. Modèles transgéniques de maladie d'Alzheimer

C'est la découverte des mutations sur les gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* dans les formes familiales de la MA, il y a un peu plus de 20 ans (Tanzi et al., 1996), qui a permis l'essor des modèles murins transgéniques de la MA. Nous détaillons ci-dessous les principales stratégies ayant été développées pour tenter de reproduire les lésions caractéristiques de la MA dans ces modèles.

C.3.1. Modèles de l'accumulation d'A β

Contrairement aux mutations des gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2*, les mutations du gène *MAPT*, codant pour la protéine Tau, ne sont pas associées à la forme familiale de la MA (FAD). Elles sont en revanche associées à la démence fronto-temporale avec syndrome Parkinsonien liée au chromosome 17 (FTDP-17, voir **Tableau 1**) (Spillantini et al., 1998). Par ailleurs, l'hypothèse de la cascade amyloïde propose que le peptide A β soit au cœur de la pathogénèse de la MA et que son accumulation soit l'élément initial d'une cascade de réactions aboutissant à la pathologie Tau et la mort neuronale (voir partie I) **B.2.3.**

L'hypothèse de la cascade amyloïde) (Hardy et al., 1986; Selkoe and Hardy, 2016). Ainsi, les efforts pour développer des modèles murins transgéniques de la MA se sont d'abord portés sur le métabolisme de l'APP.

C.3.1.1. Mutation de l'APP

L'augmentation de la quantité d'APP murine chez les souris ne suffit pas à produire une accumulation de peptide A β ; la transfection du gène codant pour l'APP humaine (hAPP) chez ces souris est nécessaire (Jankowsky et al., 2007). De plus, il a été montré que l'hAPP doit présenter au minimum l'une des mutations identifiées dans la FAD pour induire efficacement l'apparition de la lésion amyloïde (Duyckaerts et al., 2008).

Trois isoformes de hAPP ont été utilisées pour générer les différentes lignées de souris transgéniques : APP₆₉₅, APP₇₅₁ et APP₇₇₀. Parmi la vingtaine de mutations de l'hAPP identifiées, celles ayant été les plus utilisées ont été nommées d'après leur lieu de découverte ; Swedish (constituée de deux mutations contiguës : K670N & M671L), London (V171I), Indiana (V717F) et Florida (I716V) (Van Dam and De Deyn, 2006). Enfin, 4 promoteurs ont été utilisés pour permettre une expression exclusive (promoteurs PDGF, *patelet-derived growth factor*, Thy-1 et Thy-1.2, *thymus cell antigen 1 and 1.2*) ou préférentielle (promoteur PrP, *hamster prion protein*) du gène hAPP dans les neurones du système nerveux central (Duyckaerts et al., 2008).

Un très grand nombre de lignées transgéniques possédant une mutation de l'APP ont été développées ; ce sont les premiers modèles murins transgéniques de la MA à avoir vu le jour. Nous n'en ferons pas la liste exhaustive mais présenterons les modèles ayant été les plus étudiés :

- PDAPP : Il s'agit de la toute première lignée transgénique développée présentant une accumulation pathologique d'A β . Ces souris expriment la mutation Indiana sur le gène codant pour l'isoforme APP₆₉₅, sous le contrôle du promoteur PDGF. Les plaques amyloïdes ont été observées dès l'âge de 6 mois dans l'hippocampe et dès 8 mois au niveau de l'isocortex. Des dépôts amyloïdes ont également été retrouvés dans la paroi des microvaisseaux chez ces souris à partir de 24 mois. Le déficit cognitif apparaît à 6 mois (Games et al., 1995; Irizarry et al., 1997).
- Tg2576 : Ces souris expriment la double mutation Swedish sur le gène codant pour l'isoforme APP₆₉₅, sous le contrôle du promoteur PrP. Les dépôts amyloïdes ont été observés à partir de 9

mois dans le parenchyme cérébral et à partir de 16 mois dans la paroi des microvaisseaux. Le déficit cognitif apparaît à peu près à 9 mois (Hsiao et al., 1996).

- APP23 : Ces souris expriment la double mutation Swedish sur le gène codant pour l'isoforme APP₇₅₁, sous le contrôle du promoteur Thy-1.2. Les plaques apparaissent à l'âge de 6 mois dans le parenchyme cérébral et à partir de 12 mois dans la paroi des microvaisseaux. Le déficit cognitif est présent dès 3 mois. Cette lignée est la seule des modèles transgéniques de mutation de l'APP qui présente une mort neuronale significative. La perte neuronale, visible à 14 mois, touche l'hippocampe uniquement et peut atteindre 25% chez ces souris (Calhoun et al., 1998; Sturchler-Pierrat et al., 1997).
- TgCRND8 : Ces souris expriment deux mutations, la double mutation Swedish et la mutation Indiana sur le gène codant pour l'isoforme APP₆₉₅, sous le contrôle du promoteur PrP. Il s'agit d'un modèle particulièrement agressif, dans lequel le déficit cognitif apparaît dès 3 mois et les plaques amyloïdes dès 5 mois, avec une très forte concentration cérébrale d'A β et une forte augmentation du rapport A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀. Des dépôts amyloïdes ont également été observés dans la paroi des microvaisseaux aux alentours de 11 mois (Chishti et al., 2001).

Tous ces modèles présentent une augmentation de l'expression de l'APP et de la production de peptide A β induisant une pathologie amyloïde dont l'âge d'apparition dépend à la fois du transgène et du promoteur. Ainsi, ces modèles miment relativement bien la pathologie amyloïde et le déclin cognitif observés dans la MA. Cependant, ces modèles ne miment ni la pathologie Tau, ni la neurodégénérescence (sauf pour le modèle APP23 dans l'hippocampe), deux caractéristiques pathologiques importantes de la MA (Wisniewski and Sigurdsson, 2010).

D'autres stratégies ont été développées dans le but d'augmenter l'expression de l'APP. Il a été montré que le gène codant pour l'APP était situé sur le chromosome 21 chez l'Homme et que toutes les personnes présentant une trisomie 21 développaient la MA de façon relativement précoce. Le gène codant pour l'APP étant situé sur le chromosome 16 chez la souris, des modèles murins de trisomie 16 ont été développés. Les souris Ts65Dn, en particulier, présentent une augmentation des concentrations d'APP dans le striatum dès 6 mois et dans l'hippocampe et le cortex aux alentours de 13 mois. Un déficit cognitif, des concentrations cérébrales élevées d'A β ainsi qu'une dégénérescence des neurones cholinergiques ont également été observés dans ce modèle. En revanche, la pathologie Tau n'est pas retrouvée dans ce modèle murin de trisomie 16 (Hunter et al., 2003, 2004; Reeves et al., 1995).

C.3.1.2. Mutation de l'APP et des enzymes de la voie amyloïdogénique

Ces modèles double transgéniques ont été développés dans le but d'augmenter la voie amyloïdogénique du métabolisme de l'APP et ainsi favoriser la production et le dépôt d'A β . Cependant, ces modèles ne miment ni la pathologie Tau, ni la neurodégénérescence. Trois principales stratégies ont été étudiées :

- APP + BACE1

La co-expression de la β -sécrétase BACE1 et d'un transgène muté de l'hAPP a abouti à une augmentation de la production d'A β mais aussi de la densité des dépôts amyloïdes dans le parenchyme cérébral de ces souris. En revanche, une forte diminution des dépôts périvasculaires a été observée dans ce modèle. Bien que peu utilisés, ces modèles ont tout de même été très intéressants pour comprendre le rôle clé de BACE1 dans la pathologie amyloïde. En effet, d'autres modèles murins exprimant un transgène muté de l'hAPP mais KO ou mutés pour BACE1 ont montré respectivement une absence totale ou une réduction de production d'A β ainsi que de pathologie amyloïde (Luo et al., 2001; McConlogue et al., 2007; Ohno et al., 2004).

- APP x NEP-KO

La néprilysine (NEP) participe à la dégradation enzymatique des monomères et oligomères d'A β (Tarasoff-Conway et al., 2015) et peut être pharmacologiquement inhibée par le thiorphan. Chez le rat, une perfusion chronique de thiorphan provoque une augmentation significative des dépôts amyloïdes (Iwata et al., 2000). Un modèle murin de souris exprimant un transgène muté de l'hAPP, et KO pour la NEP a été développé pour mimer la pathologie amyloïde. Ces souris, nommées APP x NEP-KO présentent une intensification des dépôts au niveau de l'hippocampe et de la paroi des microvaisseaux (Farris et al., 2007), des dysfonctions synaptiques ainsi que des altérations cognitives, probablement en lien avec l'augmentation des concentrations cérébrales d'oligomères d'A β (Huang et al., 2006).

- APP + PS1

Parmi les modèles murins faisant intervenir une enzyme de la voie amyloïdogénique, les plus utilisés sont ceux associant mutation de l'hAPP et de la γ -sécrétase PS1, obtenus par croisement entre deux lignées simple transgéniques pour hAPP et PS1 (Elder et al., 2010). Il est intéressant de noter que les souris simple transgéniques pour PS1 ou PS2 ne développent pas de lésion amyloïde détectable, bien qu'elles

présentent une augmentation de la production d'A β (Elder et al., 2010; Oyama et al., 1998; Sawamura et al., 2000).

Il a été montré que la co-transfection des gènes humains mutés de l'APP et de la préséniline 1 (PS1) diminue significativement l'âge d'apparition des plaques amyloïdes et du déficit cognitif par rapport aux souris simple transgéniques (Dineley et al., 2002; Holcomb et al., 1998; McGowan et al., 1999). Cette accélération du développement de la maladie serait due à la forte augmentation de la production d'A β ₁₋₄₂ dans ce modèle. Il est intéressant de noter que la transfection des gènes non mutés (WT) de PS1 ou PS2 n'a démontré aucun effet significatif (Duff et al., 1996). Nous présentons les principaux modèles APP + PS1 :

- PSAPP : Cette lignée transgénique provient du croisement de souris Tg2576 avec des souris exprimant la mutation PS1_{M146L} de la préséniline 1 humaine sous le contrôle du promoteur PDGF. Les dépôts amyloïdes et les déficits cognitifs apparaissent respectivement 3 et 5 mois plus tôt que chez les souris Tg2576, soit à partir de 6 et 4 mois (Dineley et al., 2002; Holcomb et al., 1998).
- APP_{SL}PS1_{M146L} : Dans ce modèle murin développé par Sanofi, les souris expriment la double mutation Swedish et la mutation London sur le gène codant pour l'isoforme APP₇₅₁ sous le contrôle du promoteur Thy-1, ainsi que la mutation PS1_{M146L} de la préséniline 1 humaine sous le contrôle du promoteur HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A reductase) qui lui confère une expression préférentiellement cérébrale. L'accumulation cérébrale de peptide A β et le développement des plaques sont visibles respectivement dès 2 et 3 mois chez ces souris (Blanchard et al., 2003).
- APP_{SL}PS1_{KI} : Ces souris expriment les mêmes mutations de l'*hAPP* que le modèle précédant mais avec deux mutations (PS1_{M233T} et PS1_{L235P}) sur le gène knockin (KI) de la préséniline 1 humaine. Ces souris développent une forme très agressive de la pathologie amyloïde (plaques visibles dès 2-3 mois), associée à une importante perte neuronale et une astrogliose au niveau de les zones CA1 et CA2 de l'hippocampe dès 6 mois (Casas et al., 2004).
- APPPS1 : Ces souris expriment la double mutation Swedish sur le gène codant pour l'*hAPP* ainsi que la mutation PS1_{L166P} de la préséniline 1 humaine sous le contrôle du promoteur Thy-1. Cette lignée transgénique présente une pathologie amyloïde particulièrement précoce puisque les

plaques sont visibles dès 6-8 semaines, et une augmentation significative de la population microgliale à partir de 3 semaines (Radde et al., 2006).

- 5XFAD : Cette lignée transgénique exprime 5 mutations retrouvées dans la FAD ; les mutations Swedish, London et Florida de l'*hAPP* ainsi que deux mutations (*PS1*_{M146L} et *PS1*_{L286V}) de la préséniline 1 humaine sous le contrôle du promoteur Thy-1. Le dépôt d'Aβ est fortement accéléré dans cette lignée puisque les plaques sont visibles dès 2 mois dans le parenchyme et les dépôts périvasculaires sont visibles dès 6 mois. Ces souris présentent un déficit cognitif à partir de 4 mois et une perte neuronale à partir de 9 mois (Eimer and Vassar, 2013; Oakley et al., 2006).
- APP_{SWE}/PS1ΔE9 : Ces souris expriment la double mutation Swedish sur le gène codant pour l'*hAPP* ainsi que le gène humain de la préséniline 1, avec une délétion de l'exon 9, sous le contrôle du promoteur PrP. Cette délétion confère un gain de fonction au gène *PS1*, ce qui produit une augmentation de la production d'Aβ et de la fréquence des plaques dites en « laine de coton » (« *cotton wool plaques* ») (Lee et al., 1997). Ces plaques se caractérisent par une grande taille, une homogénéité et l'absence de cœur amyloïde. Ces souris développent les plaques aux alentours de 4-5 mois (Garcia-Alloza et al., 2006; Jankowsky et al., 2004).

Malgré les similarités qui ont pu être observées entre les modèles murins mimant l'accumulation d'Aβ et la MA, ces modèles demeurent imparfaits, notamment parce qu'ils ne présentent pas de NFTs. Le lien qui a été proposé dans l'hypothèse amyloïde entre métabolisme de l'APP et formation de NFTs n'a pas pu être reproduit et la raison de cet échec n'est pas encore connue (Duyckaerts et al., 2008). La stratégie suivante a donc été de développer un modèle permettant de combiner une accumulation d'Aβ et une pathologie Tau.

C.3.2. Modèles combinant Aβ et Tau

Les souris triple transgéniques 3xTg-AD expriment trois mutations sur les gènes *PS1*, *hAPP* et *hTau*. Cette lignée transgénique a été créée en injectant simultanément deux transgènes portant les mutations hAPP_{SWE} et hTau_{P301L}, tous deux sous le contrôle du promoteur Thy-1, dans une cellule embryonnaire murine, knockin et homozygote pour la mutation *PS1*_{M146V} (Oddo et al., 2003a). Ces souris présentent, dans un premier temps, une accumulation intracellulaire d'Aβ, qui précipite ensuite dans l'espace extracellulaire, et dans un troisième temps une pathologie Tau intracellulaire (Oddo et al., 2003b). Cette succession dans l'apparition des lésions est en accord avec l'hypothèse de la cascade amyloïde. Les

plaques sont visibles dès 6 mois dans l'isocortex, alors que les enchevêtrements neurofibrillaires apparaissent d'abord au niveau du système limbique, et pas avant 10 mois. Il a été montré que l'accumulation de protéine Tau hyperphosphorylée chez ces souris n'influe pas sur l'initiation et la progression de la pathologie amyloïde (Oddo et al., 2007). Les déficits cognitifs apparaissent de façon précoce dans cette lignée, aux alentours de 4 mois, et semblent être indépendants de la pathologie amyloïde (Billings et al., 2005). Enfin, les souris 3xTg-AD présentent également une perte neuronale (dès 4 mois), une neuroinflammation ainsi qu'un dysfonctionnement synaptique (Janelins et al., 2005).

Ainsi, la lignée 3xTg-AD mime plusieurs des caractéristiques clés de la MA ; plaques amyloïdes, pathologie Tau, neurodégénérescence et neuroinflammation. C'est pourquoi ce modèle est aujourd'hui largement utilisé. On peut cependant se demander si ce modèle possède une véritable pertinence physiologique puisqu'aucune mutation du gène codant pour la protéine Tau n'a été retrouvée dans la FAD.

C.3.3. Modèle APOE4

Le modèle APOE4 auquel nous nous intéressons ici a été créé en remplaçant le gène murin codant pour l'ApoE par l'allèle $\epsilon 4$ du gène humain *APOE* (*APOE* $\epsilon 4$), le principal facteur génétique de prédisposition pour la MA de type sporadique, grâce à la méthode du « *gene targeting* » (Knouff et al., 1999; Sullivan et al., 1997). Dans des conditions normales d'alimentation, ce modèle présente une altération de l'homéostasie plasmatique des lipoprotéines, une diminution de la clairance des VLDL et un risque accru d'athérosclérose (www.taconic.com).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, dans le cerveau l'ApoE E4 favorise la formation de plaques séniles par fixation au peptide A β . De plus, l'ApoE E4 serait responsable chez l'Homme d'une augmentation de la production d'A β et/ou d'une diminution de son élimination (voir paragraphe I) [B.3.2.1. L'allèle *APOE* \$\epsilon 4\$](#)). Ainsi, le modèle APOE4 a été utilisé pour étudier la MA, et notamment le rôle de l'ApoE et du métabolisme lipidique dans sa physiopathologie.

Une accumulation de peptide A β_{1-42} et de protéine Tau hyperphosphorylée dans les neurones de l'hippocampe a été observée chez ces souris APOE4 dès 4 mois (Liraz et al., 2013). Un déficit cognitif apparaît également à partir de 4 mois dans ce modèle (Andrews-Zwilling et al., 2010; Leung et al., 2012; Salomon-Zimri et al., 2014, 2016; Segev et al., 2013).

C.3.4. Modèles de neurodégénérescence

Les modèles murins présentés ci-dessus miment certains aspects de la MA comme les dépôts amyloïdes, la neuroinflammation, ou encore la mort neuronale. Cependant, ils ne reproduisent pas la perte généralisée et dévastatrice des neurones qui peut être observé dans la MA ; la perte neuronale reste modeste, voire totalement absente dans la plupart des modèles simple transgéniques de mutation de l'APP. Des modèles murins de neurodégénérescence ont été développés afin de mimer l'atrophie cérébrale, qui constitue l'un des principaux signes cliniques de la MA. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, la mesure de l'atrophie cérébrale en imagerie structurale par résonance magnétique fait partie des 5 biomarqueurs de la MA.

Le modèle murin de neurodégénérescence auquel nous nous intéressons plus particulièrement est le modèle CaMKII-tTA-TetO-p25-eGFP, que nous nommerons par la suite « p25 », initialement développé par le Professeur Li-Huei Tsai, et décrit pour la première fois par Cruz et collaborateurs en 2003. Il s'agit d'un modèle murin bitransgénique de surexpression inductible du gène humain codant pour la protéine p25, sous le contrôle du promoteur CaMKII. La protéine p25 est capable de modifier l'activité de la protéine kinase Cdk5.

Cdk5 est une sérine/thréonine kinase, exprimée de façon ubiquitaire, mais elle est surtout abondante dans les neurones. Elle joue un rôle primordial dans le développement du cortex cérébral, les fonctions synaptiques et la survie neuronale (Cheung and Ip, 2004; Cheung et al., 2006; Ko et al., 2001). En conditions physiologiques, Cdk5 est activée par l'un ou l'autre de ses activateurs neuronaux ; p35 et p39 (Lew et al., 1994; Tang et al., 1995; Tsai et al., 1994). La protéine p25 est le produit du clivage protéolytique par la calpaïne, une protéase à cystéine dépendante du calcium, de la protéine p35. Ce clivage est favorisé par des conditions pathologiques comme un stress oxydatif, une excitotoxicité ou une accumulation d'A β . Dans ces conditions, p25 entraîne une activation aberrante et prolongée de Cdk5, une redirection de Cdk5 vers des substrats pathologiques comme par exemple Tau ou l'APP, et conduit finalement à la mort neuronale (Cruz et al., 2003, 2006; Noble et al., 2003; Patrick and Zukerberg, 1999).

Une augmentation de l'expression de p25 ainsi que de l'activité de Cdk5 sont retrouvées dans de nombreuses maladies ND (Cheung and Ip, 2004; Patrick and Zukerberg, 1999), et en particulier dans la MA (analyse *post-mortem*) (Lee et al., 1999; Swatton et al., 2004; Tseng et al., 2002). Il est intéressant de noter qu'une augmentation de l'expression de p25 a également été retrouvée dans certains modèles

murins transgéniques de la MA comme par exemple dans le modèle 5XFAD, où une tendance à l'augmentation est observée dès 3 mois, soit bien avant la perte neuronale (Oakley et al., 2006).

Les souris p25 présentent la plupart des principales caractéristiques pathologiques de la MA :

- Neurodégénérescence : atrophie cérébrale sévère et précoce avec perte de la masse du cerveau de 13% dès 3 semaines d'induction (Brureau et al., 2017), et de plus de 30% à partir de 6 semaines (Fischer et al., 2005).
- Pathologie amyloïde : clivage aberrant de l'APP avec augmentation des concentrations cérébrales et accumulation intraneuronale d'A β insoluble (préférentiellement A β ₁₋₄₂) à partir de 8 semaines d'induction, mais absence de plaques amyloïdes extracellulaires (Cruz et al., 2006).
- Neuroinflammation : apparition d'une astroglie dans le cortex et l'hippocampe des souris à partir de 8 semaines d'induction (Cruz et al., 2003).
- Pathologie Tau : augmentation du nombre d'épitopes de Tau phosphorylés dès 5 semaines d'induction, sans modification de la quantité totale de protéine Tau (hyperphosphorylation de tau), agrégation intracellulaire de Tau hyperphosphorylée dès 12 semaines et altération de la polymérisation des microtubules (Cruz et al., 2003). La présence de NFTs dans le cortex principalement, mais aussi dans l'hippocampe, est détectée à partir de 27 semaines d'induction (Cruz et al., 2003).
- Déficit cognitif : altération des capacités d'apprentissage et de mémorisation dès 6 semaines d'induction (Cruz et al., 2003).
- Dysfonctions synaptiques : altération de la potentialisation à long-terme et diminution de la transmission synaptique dès 6 semaines (Fischer et al., 2005).

Ce modèle présente plusieurs avantages par rapport aux autres modèles murins transgéniques utilisés dans la MA :

- Contrairement aux autres modèles transgéniques de surexpression de la protéine p25, il s'agit ici d'un modèle inducible. Ainsi, l'utilisateur contrôle l'âge auquel débute l'induction, la protéine p25 s'exprime donc de façon post-natale et non de façon constitutive pendant le développement. Cela prévient l'apparition de conséquences pathologiques dues à la

surexpression de p25 au cours du développement, mais aussi la mise en place de compensations pouvant compromettre la toxicité de la protéine p25 comme cela a été observé dans des modèles transgéniques non-inductibles de surexpression de p25 (Bian et al., 2002; Takashima et al., 2001).

- L'apparition des manifestations pathologiques est extrêmement rapide suite à l'induction de l'expression de p25. Les premières lésions sont observées 3 semaines seulement après l'initiation de l'induction, contre plusieurs mois pour la plupart des autres modèles murins transgéniques (Cruz et al., 2003).
- L'augmentation de l'activité de Cdk5 produit une augmentation de la phosphorylation et une agrégation de Tau endogène, contrairement aux autres modèles transgéniques présentant une Tauopathie et pour lesquels il y a surexpression d'une protéine Tau humaine et mutée.
- Enfin, les conséquences pathologiques de l'induction de l'expression de la protéine p25 sont réversibles (Fischer et al., 2005), ce qui permet l'utilisation de ce modèle pour l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ainsi, ce modèle murin de neurodégénérescence peut être très intéressant dans la recherche sur la MA et l'évaluation de nouvelles thérapies, mais il a été relativement peu décrit depuis 2003. Nous nous sommes intéressés à l'intégrité physique et fonctionnelle de la BHE chez ces souris après 3 et 6 semaines de neurodégénérescence induite par l'expression de p25 ([Articles 1 et 3](#)). Une période de 3 semaines d'induction correspond à un stade modéré de neurodégénérescence (-13% environ du poids du cerveau), alors qu'une période de 6 semaines d'induction correspond à un stade avancé de neurodégénérescence (-30% environ du poids du cerveau), associé à la présence de protéine Tau hyperphosphorylée.

C.4. Bilan des modèles murins transgéniques utilisés dans la maladie d'Alzheimer

Modèle murin transgénique de MA	Simple transgénique (APP)	Double transgénique (APP/PS1)	Triple transgénique (APP/PS1/Tau)	APOE4	p25
Plaques séniles (âge)	✓ (3-9 mois selon la lignée)	✓ (2-6 mois selon la lignée)	✓ (6 mois)	?	(accumulation intracellulaire d'Aβ)
Angiopathie amyloïde cérébrale	✓	✓	?	?	
Pathologie Tau (NFTs) (âge)			✓ (10 mois)	?	✓ (27 semaines)
Perte neuronale	✓ pour APP23 seulement	✓	✓	✓	✓
Atrophie cérébrale				?	✓
Dysfonctions synaptiques	✓	✓	✓	✓	✓
Neuroinflammation	✓	✓	✓	?	✓
Déficit cognitif (âge)	✓ (3-9 mois selon la lignée)	✓ (4-6 mois selon la lignée)	✓ (4 mois)	✓ (4 mois)	✓ (6 semaines)
Principales références	(Chapman et al., 1999; Chishti et al., 2001; Games et al., 1995; Hsia et al., 1999; Hsiao et al., 1996; Sturchler-Pierrat et al., 1997)	(Blanchard et al., 2003; Casas et al., 2004; Holcomb et al., 1998; Jankowsky et al., 2004; Oakley et al., 2006; Viana da Silva et al., 2016)	(Billings et al., 2005; Janelsins et al., 2005; Oddo et al., 2003b, 2003a, 2007)	(Liraz et al., 2013; Miller and Federoff, 2008; Salomon-Zimri et al., 2014, 2016; Trommer et al., 2005)	(Cruz et al., 2003, 2006; Fischer et al., 2005)

Tableau 3 : Bilan simplifié des principales caractéristiques pathologiques des modèles murins transgéniques couramment utilisés dans la MA. Les âges entre parenthèses représentent les âges d'apparition des lésions.

En conclusion, aucun modèle murin ne permet de mimer parfaitement l'ensemble des caractéristiques physiopathologiques de la MA. Il conviendra donc, lors de la recherche, du développement et de l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la MA, de sélectionner le modèle murin le plus pertinent et le plus adapté selon les cas. Le choix du modèle dépendra du mécanisme d'action de la molécule à tester, de la caractéristique pathologique ciblée (pathologie amyloïde, pathologie Tau, neuroinflammation, neurodégénérescence...), mais aussi du délai d'apparition des lésions et/ou déficits cognitifs qui varient de façon importante selon les lignées transgéniques. D'autre part, il faudra veiller à explorer les modifications physiologiques provoquées par l'expression du ou des transgène(s) chez ces souris. L'intégrité de la BHE, en particulier, doit être évaluée dans le modèle sélectionné car celle-ci peut jouer un rôle significatif dans la distribution cérébrale de la molécule à l'étude et ainsi influencer son activité pharmacologique.

II) La barrière hémato-encéphalique

A.Généralités

A.1. Les barrières du cerveau

Le SNC est le centre de contrôle de l'organisme. A l'intérieur de celui-ci, les neurones communiquent entre eux grâce à une combinaison de signaux chimiques et électriques qui impliquent des mouvements d'ions extrêmement précis au travers de leurs membranes. Ainsi, la composition du liquide extracellulaire dans le SNC doit absolument être contrôlée et finement régulée afin de garantir le maintien de l'homéostasie cérébrale ainsi que le bon fonctionnement des neurones et des cellules gliales (Redzic, 2011). Les différentes barrières situées aux interfaces entre le sang et le tissu nerveux (directement ou indirectement *via* le LCR) jouent un rôle majeur dans cette régulation. Celles-ci sont au nombre de trois :

- La barrière hémato-encéphalique (BHE), située au niveau des capillaires cérébraux, est la principale interface entre le sang et le cerveau avec une surface totale d'échange de 12 à 18m² chez l'Homme (Abbott et al., 2010). Son rôle principal est de protéger le cerveau vis-à-vis des fluctuations de composition du sang circulant en termes de substances ioniques, nutritives mais aussi de substances potentiellement pathogènes, tout en permettant des échanges dynamiques entre le sang et le cerveau (nutriments, molécules de signalisation, ions, déchets métaboliques...). La structure de la BHE est détaillée dans le chapitre II) B. [Structure et fonctions de la barrière.](#)
- La barrière hémato-liquidienne (BHL), située au niveau des plexus choroïdes, à la jonction des ventricules latéraux, du 3^{ème} et du 4^{ème} ventricule, est la principale interface entre le sang et le LCR. La BHL est constituée par une couche de cellules endothéliales non jointives et d'une couche de cellules épithéliales choroïdiennes liées entre elles par des jonctions serrées. La BHL contribue également à l'homéostasie cérébrale même si elle est environ 10 fois plus perméable que la BHE (Redzic, 2011). Sa surface d'échange est environ 1000 fois plus faible que celle de la BHE (Graff and Pollack, 2004).

- Les villosités arachnoïdiennes, aussi appelées « granulations de Pacchioni », constituent la seconde interface entre le sang et le LCR. Il s'agit de petites protrusions de l'arachnoïde au niveau des sinus veineux ayant pour rôle principal le drainage du LCR, dont elles régulent le volume et la pression. L'arachnoïde, qui doit son nom à sa structure en forme de toile d'araignée, se situe entre la dure-mère et la pie-mère, et enveloppe le SNC. L'arachnoïde est constituée de plusieurs couches de cellules épithéliales reliées entre elles par des jonctions serrées. L'interface LCR/sang au niveau des villosités arachnoïdiennes est très minoritaire par rapport à celle des plexus choroïdes (Abbott et al., 2010).

Du fait de sa grande surface d'échange et son immédiate proximité avec les cellules nerveuses, la BHE est l'interface privilégiée régulant le passage des nutriments et des xénobiotiques vers le cerveau. En effet, les capillaires cérébraux en anastomoses forment un réseau vasculaire tridimensionnel qui apporte le sang au plus près de chaque neurone. La distance de diffusion maximale BHE-neurone étant de l'ordre de 25 μm chez l'Homme (Abbott et al., 2010), alors que la distance neurone-LCR peut atteindre jusqu'à plusieurs centimètres (Abbott et al., 2006). De toutes les barrières du SNC, la BHE est celle qui exerce le plus grand contrôle sur le microenvironnement neuronal (Abbott et al., 2006).

Ainsi, ce travail de thèse s'intéresse principalement à la BHE, dont nous allons détailler la structure et la fonction dans le chapitre II) [B. Structure et fonctions de la barrière.](#)

A.2. Vascularisation du cerveau

Le SNC, comme tous les autres organes, nécessite un apport régulier et constant en oxygène et nutriments essentiels afin de garantir son bon fonctionnement. Cet apport se fait *via* le sang, grâce au système vasculaire cérébral. Le cerveau est principalement irrigué par deux paires d'artères ; les artères carotides internes (droite et gauche) et les artères vertébrales (droite et gauche). Les artères carotides internes sont responsables de la vascularisation de la partie antérieure du cerveau. Les artères vertébrales fusionnent à la base du crâne pour former le tronc basilaire qui assure la vascularisation de la partie postérieure du cerveau et de la moelle épinière. Ces réseaux artériels antérieurs et postérieurs communiquent entre eux grâce à des artères communicantes. Le tout constitue le polygone de Willis, ou cercle artériel du cerveau. Le cerveau reçoit la majorité de son apport en oxygène et nutriments par l'intermédiaire de ce polygone. Grâce à l'anastomose entre toutes les artères irrigant le cerveau, le polygone de Willis permet de compenser l'éventuelle insuffisance de perfusion de l'une d'entre elles, comme par exemple en cas d'obstruction ou de sténose (Farkas and Luiten, 2001; Vrselja et al., 2014).

De ce polygone de Willis naissent les principales artères cérébrales. Les artères carotides internes donnent naissance à deux paires d'artères essentielles : les artères cérébrales antérieures, qui vascularisent les pôles frontaux et les parties médianes des lobes frontaux et pariétaux, et les artères cérébrales moyennes, qui vascularisent la majeure partie des surfaces latérales des hémisphères cérébraux. Les artères cérébrales moyennes sont les plus volumineuses des artères corticales et transportent 80% du sang destiné aux hémisphères cérébraux. Le tronc basilaire, quant à lui, donne naissance aux artères cérébrales postérieures qui vascularisent les parties inférieures et médianes des lobes temporaux et occipitaux, le cervelet et le tronc cérébral (Farkas and Luiten, 2001).

Les artères cérébrales se propagent à la surface du cortex puis perforent le parenchyme cérébral perpendiculairement à sa surface pour apporter le sang à la région adéquate. Se faisant, elles se divisent progressivement en artères plus petites et en artérioles qui n'établissent pas d'anastomoses entre elles. Il n'y a donc plus de possibilité de suppléance vasculaire à ce niveau. Au fur et à mesure de cette ramification, le diamètre des artères diminue, et leurs structures et fonctions se modifient ;

- Les artères piales, ou leptoméningées, sont situées à la surface du cortex dans l'espace sub-arachnoïdien. Elles sont formées de trois couches concentriques : l'intima, constituée d'une simple couche de cellules endothéliales et d'une lame élastique interne, la media, constituée de deux à trois couches de cellules musculaires lisses, et l'adventice, constituée de fibres de collagène, de fibroblastes et de nerfs périvasculaires. La fonction principale de ces artères est de réguler la pression sanguine cérébrale (Iadecola, 2004).
- En plongeant dans le cortex, les artères piales se transforment en artères pénétrantes. Celles-ci sont entourées d'une gaine constituée par l'espace de Virchow-Robin, et baignent dans le LCR. Leur structure est intermédiaire entre les artères piales et les artérioles (Iadecola, 2004).
- En pénétrant plus profondément dans le cortex, les artères pénétrantes donnent naissance aux artérioles parenchymateuses. Les artérioles ne possèdent qu'une seule couche de cellules musculaires lisses, ne sont plus innervées de façon extrinsèque comme les artères piales mais de façon intrinsèque grâce à leur interaction avec les interneurones, et s'entourent de pieds astrocytaires (Iadecola, 2004).
- Enfin, on parle de capillaires lorsque les cellules musculaires lisses sont entièrement remplacées par des péricytes. Grâce à leur endothélium hautement spécialisé, les capillaires ont une

propriété de barrière ; ils sont le siège de la BHE (Cipolla, 2009). La densité de ce réseau de capillaires varie en fonction de l'activité et des besoins en nutriments de la région cérébrale. Par exemple, la densité capillaire est environ trois fois plus intense dans la substance grise, en particulier dans les zones riches en synapses, que dans la substance blanche (Farkas and Luiten, 2001).

A.3. Mise en évidence de l'existence d'une barrière

La première expérience mettant en évidence l'existence de la BHE remonte à plus de 100 ans (Saunders et al., 2014). En effet, en 1885, Paul Ehrlich, un médecin et scientifique allemand, injecte chez l'animal différents colorants par voie sous-cutanée (SC) afin d'étudier l'utilisation de l'oxygène par différents organes. Il observe que certains d'entre eux, comme l'alizarine ou l'indophénol colorent la substance grise du cerveau alors que d'autres colorants aux particules plus volumineuses, comme le vert d'anthracène, ne colorent pas le cerveau (Ehrlich, 1885). Malheureusement, il interprète mal ces résultats et suggère que certains colorants ont une faible affinité pour le cerveau. Il déclare même en 1906 que l'endothélium vasculaire ne peut, selon lui, avoir des fonctions ou propriétés (notamment de perméabilité) différentes selon les organes (Ehrlich, 1910). En 1900, Lewandowsky, un neurologue allemand, montre que l'injection directe dans le cerveau de strychnine ou de ferrocyanure de sodium est toxique à une dose beaucoup plus faible que lors d'une injection intraveineuse (IV) ou SC. Il est le premier à suggérer que la plus faible pénétration cérébrale de ces toxines à la suite d'une injection IV ou SC provient d'une différence dans les propriétés des vaisseaux cérébraux par rapport à ceux des autres tissus. Il propose ainsi l'hypothèse que l'endothélium cérébral possède des propriétés spécifiques restreignant le passage de certains composés dans le SNC (Lewandowsky, 1900). D'autre part, entre 1906 et 1913, Goldmann, l'un des étudiants d'Ehrlich, réalise deux expériences majeures. Dans la première, il injecte du bleu de trypan par voie systémique chez le rat et confirme les observations d'Ehrlich ; le cerveau n'est pas coloré (Goldmann, 1909). Dans la seconde, il injecte le même colorant dans le LCR directement, et constate que le cerveau et la moelle épinière sont entièrement colorés mais pas le reste de l'organisme (Goldmann, 1913).

Ces observations sont en contradiction avec les conclusions d'Ehrlich. Cependant, Goldmann n'offre pas à cette époque d'explication aux phénomènes qu'il observe (Goldmann, 1913). C'est en 1918 que le terme de « barrière » est utilisé pour la première fois par Stern et Gautier à Genève. Suite à l'étude de la distribution cérébrale d'un grand nombre de substances, ils établissent qu'une « barrière s'oppose au passage dans le LCR de substances circulant dans le sang », et rajoutent que celle-ci varie selon les espèces (Stern and Gautier, 1918a, 1918b). Ils introduiront par la suite et pour la première fois l'appellation de « barrière hémato-encéphalique » en 1921. Même si nous savons aujourd'hui que la BHE n'est pas qu'un simple obstacle absolu au passage des molécules mais qu'elle est le siège de nombreux échanges bidirectionnels, le terme de « barrière » hémato-encéphalique a perduré et la contribution de Lina Stern au domaine de la biologie cérébrale est aujourd'hui largement reconnu (Saunders et al., 2014, 2016).

Toutes ces expériences ont ainsi permis de mettre en évidence l'existence d'une barrière entre le sang et le cerveau. L'identification des éléments histologiques responsables du phénotype de la barrière, quant à elle, a été réalisée en 1967 grâce aux avancées technologiques en matière de microscopie. En effet, Reese et Karnovsky montrent, par microscopie électronique en transmission (MET) associée à l'injection IV de peroxydase de raifort, que les capillaires cérébraux sont constitués de cellules endothéliales liées entre elles par des jonctions serrées (Reese and Karnovsky, 1967). Ces jonctions serrées, limitant tout passage paracellulaire, rendent l'endothélium vasculaire cérébral beaucoup plus étanche que l'endothélium vasculaire présent dans le reste de l'organisme qui en est majoritairement dépourvu.

B. Structure et fonctions de la barrière

B.1. Notion d'unité neuro-vasculaire

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (CECCs) constituent l'unité anatomique primaire de la BHE. Cependant, il est dorénavant reconnu que l'endothélium cérébral se situe au centre d'une structure cellulaire complexe appelée unité neuro-vasculaire (UNV). Celle-ci est constituée des CECCs, d'une lame basale, des péricytes, des pieds astrocytaires, des terminaisons neuronales avoisinantes et de cellules microgliales. Tous les constituants de l'UNV interagissent étroitement dans le but de maintenir les propriétés de la BHE.

B.1.1. Les cellules endothéliales

Ces cellules sont hautement spécialisées afin de conférer ses propriétés à la barrière. Cette spécialisation, qui les différencie des cellules endothéliales du reste de l'organisme, comprend l'expression de complexes jonctionnels entre les cellules adjacentes, l'absence de fenestrations, une pinocytose réduite et l'expression d'enzymes et de transporteurs spécialisés (Erickson and Banks, 2013). Les CECCs sont ancrées dans une lame basale continue dans laquelle sont enchâssés des péricytes. Ce sont des cellules polarisées avec un pôle luminal au contact direct du sang circulant et un pôle abluminal au contact du parenchyme cérébral. Chacun des deux pôles exprime un éventail de protéines membranaires spécifiques. Enfin, les CECCs possèdent un nombre élevé de mitochondries qui leur fournissent l'énergie nécessaire à leur activité métabolique intense et au fonctionnement des protéines de transport actif (Oldendorf et al., 1977; Weiss et al., 2009).

L'étanchéité de la BHE est principalement due à la présence des complexes jonctionnels reliant les membranes plasmiques des CECCs adjacentes, limitant fortement tout passage paracellulaire. Ces complexes jonctionnels sont responsables de la résistance électrique transendothéliale très élevée des CECCs par rapport aux cellules endothéliales périphériques (Redzic, 2011). Les complexes jonctionnels restreignent également la diffusion latérale des protéines membranaires des CECCs, permettant ainsi le maintien de la polarité de la BHE (Cereijido et al., 1998). Ces complexes sont constitués de jonctions serrées (JSs), de jonctions adhérentes (JAs) et aussi possiblement de jonctions *gap* (JGs) (Simard et al., 2003; Tao-Cheng et al., 1987). Si les jonctions *gap* seraient plutôt impliquées dans la communication intercellulaire, les JSs et les JAs ont pour rôle principal de restreindre la perméabilité de l'endothélium cérébral (Hawkins and Davis, 2005).

B.1.1.1. Les jonctions serrées

Les JSs sont constituées de protéines transmembranaires ; les occludines, les claudines et les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAMs), reliées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de protéines adaptatrices cytoplasmiques, aussi appelées *zonula occludens* (ZO).

- L'occludine, phosphoprotéine d'environ 65 kDa et possédant 4 domaines transmembranaires, présente une abondance particulièrement élevée dans l'endothélium cérébral, contrairement à l'endothélium du reste de l'organisme (Furuse et al., 1993; Hawkins and Davis, 2005). Si l'occludine participe au maintien de la résistance électrique transendothéliale des CECCs, elle ne semble pas jouer un rôle essentiel dans la formation des JSs (Furuse et al., 1998). En effet, des

études ont montré que des souris knockout ou knockdown pour l'occludine, c'est-à-dire n'exprimant pas l'occludine, présentent tout de même une BHE fonctionnelle (Hawkins and Davis, 2005; Saitou et al., 2000). Cela reste encore controversé, certaines équipes ayant montré qu'une diminution de l'expression de l'occludine est associée avec une altération de la BHE, comme c'est le cas par exemple dans les douleurs de type inflammatoire (Huber et al., 2001, 2002).

- Les claudines sont une famille d'au moins 24 protéines de 20 à 27 kDa et possédant également 4 domaines transmembranaires. À la BHE, ce sont majoritairement la claudine-3, -5 et -12 qui sont exprimées (Abbott et al., 2006; Luissint et al., 2012a). Contrairement à l'occludine, les protéines de la famille des claudines sont primordiales pour la formation et le bon fonctionnement des JSs (Redzic, 2011). La claudine-5 plus particulièrement semble avoir un rôle clé dans le maintien de l'étanchéité des JSs. En effet, il a été observé chez des souris KO pour la claudine-5, une augmentation de la perméabilité de la BHE pour des molécules de moins de 800 Da, conduisant à d'importantes perturbations cérébrales et à la mort prématurée des souris (Nitta et al., 2003). De la même façon, une augmentation de la perméabilité des JSs a été observée *in vitro* sur des cellules endothéliales cérébrales humaines en culture (lignée hCMEC/D3) en cas de déplétion de la claudine-5 (Luissint et al., 2012b).
- Les molécules d'adhésion jonctionnelle, quant à elles, appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig), ne possèdent qu'un seul domaine transmembranaire de 40 kDa et comptent trois membres : JAM-A, -B et -C (Dyrna et al., 2013). Les JAMs participent à la formation et au maintien des JSs (Abbott et al., 2006) et seraient impliquées dans la régulation de la migration transendothéliale des leucocytes en cas d'inflammation mais leurs fonctions précises sont encore peu connues (Ebnet et al., 2004; Johnson-Léger and Imhof, 2003; Muller, 2003).

Toutes ces protéines transmembranaires sont reliées *via* leur extrémité C-terminale aux filaments d'actine du cytosquelette des CECCs par des protéines cytosoliques, appelées protéines adaptatrices : les protéines *zonula occludens* (ZO) (Wolburg and Lippoldt, 2002). Cette association avec le cytosquelette se fait par l'intermédiaire d'autres protéines cytosoliques comme par exemple la cinguline, et assure l'efficacité des JSs (Abbott et al., 2010; Tornavaca et al., 2015). Les protéines ZO appartiennent à la

famille des protéines MAGUK (*membrane-associated guanylate-kinase*), dont on retrouve trois représentants à la BHE : ZO-1, -2 et -3 (Hawkins and Davis, 2005; Redzic, 2011).

Enfin, les JSs doivent être considérées comme des structures complexes et dynamiques, pouvant être modulées par l'ensemble des composants de l'UNV. En effet, toute modification des concentrations intra- et extracellulaires en calcium va fortement moduler l'assemblage et la fonctionnalité des JSs ainsi que la résistance électrique transendothéliale des CECCs (Abbott et al., 2006; Balda et al., 1991). De plus, toutes les cellules avoisinantes de l'UNV sécrètent des substances vasoactives ainsi que des cytokines, ce qui leur permet de contrôler l'assemblage des JSs et la perméabilité de la BHE (Abbott et al., 2006; Rennels et al., 1983).

B.1.1.2. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont constituées de glycoprotéines transmembranaires dépendantes du calcium appelées VE-cadhérines (*vascular endothelial cadherin*), et reliées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de protéines cytosoliques ; les caténines (Harrison et al., 2011; Hawkins and Davis, 2005). Les JAs interviennent dans la régulation de l'angiogenèse et le maintien de l'intégrité de la BHE (Brown and Davis, 2002). Il a cependant été établi que ce sont les JSs principalement qui confèrent à la BHE sa faible perméabilité paracellulaire et sa résistance électrique transendothéliale élevée (Hawkins and Davis, 2005; Rodrigues and Granger, 2015).

B.1.1.3. Les jonctions gap

Les jonctions *gap*, ou jonctions communicantes, sont constituées de canaux intercellulaires permettant de mettre en relation les cytoplasmes de deux cellules voisines. Chaque canal intercellulaire est constitué de deux lots de six protéines transmembranaires appartenant à la famille des connexines (Cx). Les connexines exprimées dans les CECCs sont Cx37, Cx40 et Cx43. Un hexamère de connexines constitue un hémicanal, l'association de deux hexamères voisins donnera un canal hydrophile d'environ 2 nm de diamètre (= une jonction *gap*). Les JGs sont essentielles pour la communication intercellulaire en permettant l'échange d'ions et de petites molécules entre cellules voisines (Goodenough et al., 1996; Saez et al., 2003; Stamatovic et al., 2016).

B.1.2. La membrane basale

Une membrane basale continue, aussi appelée lame basale, d'une épaisseur de 20 à 200 nm, entoure les CECCs et péricytes au niveau du pôle abluminal de la BHE (Thomsen et al., 2017). Elle constitue

également un élément d'ancrage pour les pieds astrocytaires. La membrane basale joue un rôle important dans le développement des vaisseaux, la stabilité structurelle et le maintien des propriétés de la BHE (Morris et al., 2014). Elle est constituée d'un assemblage de glycoprotéines extracellulaires appartenant à 4 familles : les laminines, les nidogènes, les protéoglycanes à sulfate d'héparane (l'agrine et le perlecan) et les collagènes (plus particulièrement le collagène de type IV) (Thomsen et al., 2017). La composition de la membrane basale, en particulier l'expression des différentes isoformes de laminine, varie en fonction de sa position dans l'arbre vasculaire cérébral. Ces différences ont une forte influence sur les fonctions de la membrane basale comme par exemple la transduction de signaux contrôlant la migration, survie, prolifération et différenciation cellulaire (Yousif et al., 2013). Ainsi, toute modification dans la composition protéique de la membrane basale peut avoir des conséquences sur la fonctionnalité et l'intégrité de la BHE. C'est d'ailleurs le cas dans différentes pathologies cérébrales comme par exemple la MA (Farkas and Luiten, 2001; Perlmutter, 1994; Shimizu et al., 2009).

B.1.3. Les péricytes

Les péricytes, aussi appelées « cellules de Rouget » du nom du chercheur les ayant décrites pour la première fois, sont les cellules murales des capillaires, comme le sont les cellules musculaires lisses pour les artères et artérioles. Ils sont présents au niveau des capillaires de la majorité des tissus de l'organisme mais sont particulièrement abondants dans le SNC (Shepro and Morel, 1993). Il a d'ailleurs été montré que le ratio péricytes/CECCs est corrélé avec le phénotype de « barrière » de l'endothélium (Weiss et al., 2009). Les péricytes, disposés de façon intermittente le long du mur endothélial, possèdent de longs prolongements cytoplasmiques qui encerclent le capillaire et peuvent recouvrir plusieurs CECCs (Mathiisen et al., 2010). Les péricytes communiquent avec les autres membres de l'UNV soit par contact direct soit grâce à des voies de signalisation et jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la BHE par stabilisation des jonctions serrées (Daneman et al., 2010; Janzer and Raff, 1987; Shimizu et al., 2009). Ils participent à la synthèse de la lame basale, régulent la migration et la survie des cellules endothéliales et participent à l'angiogenèse (Díaz-Flores et al., 2009; Kamouchi et al., 2011; Weiss et al., 2009). Les péricytes sont également considérés comme étant la première ligne de défense en cas de rupture de la BHE grâce à leurs capacités de phagocytose (Broadwell and Salzman, 1981). Enfin, du fait de leur richesse en protéines contractiles comme l'actine, et de leur disposition tout autour des capillaires, les péricytes seraient impliqués dans le contrôle du flux sanguin cérébral (Dalkara et al., 2011; Kamouchi et al., 2011). Ainsi, les péricytes ont un rôle clé dans le bon fonctionnement neurovasculaire. Il

a été montré chez des souris déficientes en péricytes une augmentation de la perméabilité de la BHE ainsi qu'une altération de la vascularisation cérébrale, le tout entraînant une neurodégénérescence progressive (Armulik et al., 2010; Bell et al., 2010; Winkler et al., 2011).

B.1.4. Les astrocytes péri-vasculaires

Les astrocytes sont des cellules gliales qui encerclent le pôle abluminal des capillaires cérébraux par l'intermédiaire de leurs prolongements cytoplasmiques, appelés pieds astrocytaires. Ce sont les cellules non-neuronales les plus abondantes au niveau du SNC ; elles recouvrent de leurs pieds plus de 95% de la surface de l'endothélium cérébral (Persidsky et al., 2006; Vorbrodt and Dobrogowska, 2003). Huit des onze phénotypes existants d'astrocytes ont une interaction spécifique avec les vaisseaux sanguins (Abbott et al., 2006). De plus, leur abondance et leur proximité avec les CECCs suggèrent un rôle important des astrocytes dans le maintien de l'intégrité de la BHE. Les astrocytes sécrètent plusieurs molécules effectrices, comme le facteur de croissance transformant β (TGF β , *transforming growth factor beta*), le facteur neurotrophe dérivé de la glie (GDNF, *glial cell line-derived neurotrophic factor*), le facteur basique de croissance des fibroblastes (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) ou encore l'angiopoïétine 1 (ANG1, *angiopoietin 1*), dans le but d'induire et de maintenir le phénotype de la BHE (Abbott et al., 2006). Il a été montré *in vitro* que la présence d'astrocytes permet d'augmenter significativement l'efficacité des jonctions serrées ainsi que la résistance électrique transendothéliale, l'expression polarisée de certains transporteurs membranaires comme la P-gp (*permeability glycoprotein*) ou GLUT1 (*glucose transporter 1*), ou encore l'expression de certaines enzymes au niveau des CECCs (Haseloff et al., 2005; Hayashi et al., 1997; McAllister et al., 2001; Schinkel, 1999; Sobue et al., 1999). Il a aussi été montré que les astrocytes sont indispensables à la correcte association des CECCs et des péricytes (Abbott et al., 2006). Des études *in vivo* ont confirmé ces résultats en montrant que la perte sélective des astrocytes au niveau du SNC du rat et de la souris provoque une augmentation de la perméabilité de la BHE (Bush et al., 1999; Willis et al., 2004). Les astrocytes sont également impliqués dans la régulation du flux vasculaire, de la vasodilatation des vaisseaux et de l'entrée d'eau dans le parenchyme cérébral (Bernacki et al., 2008; Keaney and Campbell, 2015). Enfin, les astrocytes établissent des contacts par l'intermédiaire de leurs prolongements cytoplasmiques avec les autres constituants de l'UNV comme par exemple les neurones, et jouent un rôle particulièrement important dans la formation et le fonctionnement des synapses (Pfrieger and Barres, 1996). Les astrocytes sont donc, tout comme les péricytes, très impliqués dans l'acquisition et le maintien du phénotype de la BHE. Une perturbation de la

BHE est observée dans de nombreuses pathologies du SNC, et dans la majorité des cas, la coopération CECCs-astrocytes a été retrouvée altérée (Abbott et al., 2006).

B.1.5. La microglie

La microglie est une sous-population des cellules gliales, comme les astrocytes, constituée par les « macrophages résidents » du SNC. Elle se différencie des astrocytes par son origine hématopoïétique. De forme étoilée et capables de phagocytose, les cellules de la microglie jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée du SNC. Elle représente la principale ligne de défense du cerveau et de la moelle épinière, après la BHE. Son rôle exact dans la formation et la régulation de la BHE n'est pas encore totalement élucidé. En revanche, il a été montré que la microglie est anormalement activée dans les pathologies du SNC, comme par exemple la MA, et que cette activation s'accompagne d'une neuroinflammation et d'un recrutement de leucocytes dans le SNC (da Fonseca et al., 2014; Keaney and Campbell, 2015).

B.2. Mécanismes de transport au travers de la barrière

Comme nous l'avons décrit, la présence des jonctions serrées entre les CECCs confère à la BHE son phénotype de barrière et sa perméabilité réduite en limitant tout passage paracellulaire. Ainsi, pour rejoindre le cerveau, les molécules endogènes comme exogènes doivent obligatoirement emprunter la voie transcellulaire, c'est-à-dire traverser la membrane plasmique des cellules endothéliales. De plus, la très faible présence de vésicules d'endocytose (pinocytose) au niveau de ces CECCs contribue à limiter encore le passage des molécules au travers de la BHE. Le transport de molécules peut cependant se faire grâce à différents mécanismes, en fonction de la nature de la molécule, que nous allons détailler ci-après ; la diffusion passive, le transport médié par des protéines ou la transcytose (Abbott et al., 2010).

B.2.1. Diffusion passive

La diffusion passive, aussi appelée diffusion simple, est, au niveau de la BHE, un mode de transport transcellulaire du fait de la présence des JSs. Il s'agit d'un processus non saturable et ne nécessitant pas d'énergie. Elle n'implique pas de transporteurs et peut être bidirectionnelle. La diffusion se fait suivant le gradient de concentration de la molécule, c'est-à-dire du compartiment le plus concentré vers le moins concentré, comme le prévoit la loi de Fick. Tous les solutés ne sont pas éligibles à la diffusion passive. Ce sont les propriétés physico-chimiques de la molécule qui vont déterminer son aptitude à franchir la bicouche phospholipidique que constitue la membrane des cellules endothéliales. Une lipophilie

importante est à priori en faveur d'une bonne perméabilité cérébrale. Plusieurs équipes ont ainsi montré qu'il existait une corrélation linéaire entre la lipophilie d'une molécule (exprimée généralement en LogP ; le logarithme du coefficient de partition octanol/eau) et sa perméabilité cérébrale (exprimée généralement en LogPS ; le logarithme du produit perméabilité-surface) (Dagenais et al., 2009; Murakami et al., 2000; Neuwelt et al., 2008). Mais d'autres paramètres physico-chimiques sont à prendre en compte car être lipophile n'est pas une condition suffisante pour traverser la BHE par diffusion passive. Une règle empirique, dite « règle des 5 » de Lipinski, définit les caractéristiques physico-chimiques que doit posséder une molécule pour être une bonne candidate à la diffusion passive (Lipinski et al., 2001; Mikitsh and Chacko, 2014):

- poids moléculaire < 500 Dalton (Da) (la molécule ne doit pas être trop volumineuse),
- LogP ne doit pas dépasser 5 (la molécule doit être suffisamment lipophile, mais pas trop),
- nombre de liaisons hydrogène accepteur < 2×5 (= 10)
- et nombre de liaisons hydrogène donneur < 5 (la molécule doit établir un nombre limité de liaisons hydrogènes).

D'autres paramètres comme la polarité de la molécule, son état d'ionisation et l'affinité avec laquelle elle se lie aux protéines plasmatiques ou tissulaires peuvent aussi influencer la perméabilité cérébrale d'une molécule (Abbott et al., 2010). Parmi les substances traversant la BHE par diffusion passive se trouvent des gaz comme le dioxygène (O₂) et le dioxyde de carbone (CO₂), des molécules endogènes comme les acides gras ou encore des xénobiotiques agissant sur le SNC comme les barbituriques ou l'éthanol (Abbott et al., 2006). Cependant, les propriétés physico-chimiques d'une molécule ne permettent pas toujours de prédire correctement son passage au travers de la BHE. En effet, d'autres mécanismes de transport existent à la BHE : le transport actif ou facilité, médié par des protéines ou encore la transcytose.

B.2.2. Transport médié par les *solute carriers* (SLC)

Le phénotype de barrière de la BHE isole le cerveau de nutriments hydrophiles et/ou polaires, essentiels pour son fonctionnement, comme le glucose, la plupart des acides aminés, les nucléosides ou encore certains ions. Ces substances sont apportées au SNC grâce aux transporteurs SLC (*solute carriers*) situés à la membrane des CECCs. Les transporteurs SLC appartiennent à une superfamille de protéines

comportant environ 395 membres classés en 52 familles (Hediger et al., 2013; Lin et al., 2015). Certains d'entre eux ont une expression polarisée et sont retrouvés uniquement au pôle luminal ou abluminal de la BHE, d'autres sont exprimés aux deux pôles de la BHE. Cette polarisation des transporteurs SLC à la BHE est maintenue grâce aux protéines des jonctions serrées, empêchant tout mouvement des transporteurs d'un côté à l'autre de l'endothélium. De plus, les transporteurs SLC peuvent transporter leur substrat soit de manière bidirectionnelle, le sens du transport dépendra alors du gradient de concentration du substrat ou du gradient électrochimique pour les ions, soit de manière unidirectionnelle, dans le sens de l'influx ou de l'efflux, ou encore par échange de substrats. Ainsi, le substrat pourra être transporté du sang vers le cerveau ou inversement selon la localisation du transporteur et son mécanisme d'action (Abbott et al., 2010).

Le transport de molécules médié par les transporteurs SLC peut être passif, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de consommation d'énergie, on parle alors de diffusion facilitée. La diffusion facilitée se fait dans le sens du gradient de concentration du substrat et est saturable. Le transport peut aussi être secondairement actif, c'est-à-dire qu'il dépend d'un gradient électrochimique ou bien d'un gradient ionique généré par des pompes ATP-dépendantes, pour faciliter le passage ou bien transporter le substrat contre son gradient de concentration. Enfin, il peut être actif de façon tertiaire, c'est-à-dire qu'il s'appuie sur les gradients générés par les transporteurs secondairement actifs pour s'opposer au gradient de concentration de leur substrat (Ohtsuki and Terasaki, 2007). A la différence des transporteurs ABC, les transporteurs SLC ne possèdent pas de site de liaison pour l'ATP et n'hydrolysent jamais directement d'ATP pour transporter leurs substrats.

Enfin, la superfamille des SLC présente une grande hétérogénéité dans la spécificité de ses membres pour leur(s) substrat(s). Les transporteurs peuvent être très spécifiques pour leur substrat comme par exemple le transporteur CTL1 (ou SLC44A1), appartenant à la famille SLC44A, qui ne transporte que la choline (Abbott et al., 2010). Au contraire, les transporteurs SLC peuvent transporter un large spectre de substrats comme par exemple les transporteurs OAT1 et OAT3 (ou respectivement SLC22A6 et SLC22A8), appartenant à la famille SLC22A. OAT1 et OAT3 sont des échangeurs d'anions et transportent dans le sens de l'influx une grande variété d'anions organiques hydrophiles contre leur gradient de concentration en échange d'acides dicarboxyliques. Ils transportent, entre autres, des nucléotides, des prostaglandines et l'acide urique mais également de nombreux xénobiotiques, en particulier des antibiotiques, des anti-inflammatoires non stéroïdiens, des antiviraux et des agents antinéoplasiques (Koepsell and Endou, 2004; Lin et al., 2015; Nagle et al., 2013; Ohtsuki and Terasaki, 2007).

Parmi les transporteurs SLC exprimés à la BHE, certains jouent un rôle particulièrement important dans le transport de substances endogènes essentielles au bon fonctionnement du SNC comme le glucose ou les acides aminés essentiels.

B.2.2.1. Transport du glucose

Les protéines de la famille GLUT transportent les hexoses, en particulier le glucose, à la membrane plasmique de toutes les cellules de l'organisme et appartiennent à la superfamille majeure des facilitateurs (*major facilitator superfamily*, MFS) (Mueckler and Thorens, 2013). L'isoforme majoritaire exprimée à la BHE est le GLUT1 (*glucose transporter 1* ou SLC2A1), codé par le gène *SLC2A1* (Yeh et al., 2008). GLUT1 est présent dans deux conformations différentes à la membrane luminale et abluminale de la BHE et transporte le D-glucose, principale source d'énergie du cerveau, dans le sens de l'influx (du sang vers le cerveau). Ce transport se fait de manière facilitée, c'est-à-dire sans consommation d'énergie, et indépendamment du sodium (Abbott et al., 2006; Kumagai, 1999; Simpson et al., 2001). L'existence de GLUT1 explique la grande perméabilité cérébrale du glucose en dépit de son hydrophilie. Bien que GLUT1 puisse transporter le glucose de façon bidirectionnelle, le cerveau catabolise très rapidement le glucose ce qui crée un gradient de concentration de glucose dans le sens de son entrée dans le cerveau (Patching, 2017). GLUT1 possède un K_m relativement élevé (estimé entre 2 et 11 mM chez le rongeur) (Cattelotte et al., 2008; Puchowicz et al., 2004) par rapport à la glycémie physiologique (entre 3,9 et 6,1 mM), de sorte que le transport du glucose n'est généralement pas un facteur limitant pour le métabolisme cérébral (Devraj et al., 2011). L'influx cérébral de glucose peut cependant devenir limitant en cas d'hypoxie, d'ischémie ou encore d'hypoglycémie chronique (Simpson et al., 2007). GLUT1 transporte également l'acide ascorbique sous sa forme oxydée (acide déshydroascorbique), fournissant la vitamine C au SNC où elle joue un rôle primordial d'antioxydant et de cofacteur dans de nombreuses réactions enzymatiques comme par exemple la synthèse des catécholamines (Agus et al., 1997; Harrison and May, 2009). Ainsi, GLUT1 est essentiel pour le maintien des fonctions neurologiques normales et toute modification de son expression ou de son fonctionnement peut avoir de graves conséquences sur l'homéostasie cérébrale (Patching, 2017). Des modulations de l'expression de GLUT1 sont par ailleurs retrouvées dans certaines pathologies neurodégénératives comme par exemple la MA (Campos-Bedolla et al., 2014).

B.2.2.2. Transport des acides aminés essentiels

Les acides aminés neutres de haut poids moléculaire (*large neutral amino acids*, LNAAs) incluent la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, la thréonine, la méthionine, la valine, la leucine, l'isoleucine et

l'histidine (van Spronsen et al., 2009). Tous, à l'exception de la tyrosine, sont des acides aminés essentiels, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas ou insuffisamment synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Au niveau du SNC, ils sont particulièrement importants car ils participent à la synthèse de protéines et de neurotransmetteurs. Les LNAAs sont transportés au travers de la BHE par un complexe appelé système L (Campos-Bedolla et al., 2014). Le système L est constitué de LAT1 (*large neutral amino acid transporter 1* ou SLC7A5), codé par le gène *SLC7A5*, et du 4F2hc (*heavy chain of the 4F2 cell-surface antigen*), codé par le gène *SLC3A2* (Kageyama et al., 2000). L'association de LAT1 avec le 4F2hc est nécessaire à son expression fonctionnelle. LAT1 est exprimé à la membrane luminale et abluminale de la BHE et transporte les LNAAs de façon facilitée et bidirectionnelle, mais principalement dans le sens de l'influx (Abbott et al., 2010). L'acide aminé ayant la plus grande perméabilité cérébrale est la phénylalanine avec une clairance d'entrée d'environ 20 $\mu\text{L/g/sec}$ soit près de 20 fois plus élevée que celle du glucose ([Article 1](#)). LAT1 peut également transporter des xénobiotiques dans le sens de l'influx comme cela a été montré pour la L-Dopa, la gabapentine ou encore le baclofène (Ohtsuki and Terasaki, 2007).

B.2.2.3. Autre transporteur de substances endogènes : OATP1A2 ; Organic anion transporting polypeptide 1A2

OATP1A2 (*organic anion transporting polypeptide 1A2*) est un transporteur de la famille des OATPs (*organic anion transporting polypeptides* ou SLCO/SLC21), codé par le gène *SLCO1A2* (Hagenbuch and Meier, 2004). Les OATPs sont des transporteurs d'anions organiques polyspécifiques et sont exprimés dans de nombreux tissus comme le rein, le foie, l'intestin, le placenta, le plexus choroïde et le cerveau (Gao et al., 2015; Roth et al., 2012). Les OATPs sont capables de transporter leurs substrats (en général des anions organiques principalement hydrophobes et de grande taille) de manière bidirectionnelle, à priori par échange d'anions (Hagenbuch and Meier, 2003; Roth et al., 2012).

OATP1A2 est un transporteur transmembranaire d'environ 74 kDa constitué de 12 hélices transmembranaires (Hagenbuch and Meier, 2003). Son mécanisme de transport n'est à ce jour pas totalement connu. Il a toutefois été montré que celui-ci était indépendant de l'ATP et du sodium mais probablement dépendant du pH (Klaassen and Aleksunes, 2010; Leuthold et al., 2009).

OATP1A2 a été retrouvé dans le cerveau, le foie, le rein, le poumon et les testicules (Gao et al., 2015; Kullak-Ublick et al., 1995, 1998). Au niveau du cerveau, OATP1A2 est exprimé aux membranes luminale et abluminale des CECCs (Gao et al., 2015). Son orthologue à la BHE chez le rongeur est *Oatp1a4*, codé

par le gène *Slco1a4* (Roth et al., 2012). OATP1A2 (et Oatp1a4) sont impliqués dans le transport de nombreuses substances endogènes comme des acides biliaires, des hormones thyroïdiennes, des stéroïdes ou des peptides mais aussi d'une grande variété de xénobiotiques comme des statines, fluoroquinolones, bêtabloquants, glycosides cardiaques ou encore certains agents antiviraux (Roth et al., 2012). Enfin, des travaux chez la souris suggèrent qu'Oatp1a4 pourrait être impliqué dans l'influx cérébral du peptide A β (Do et al., 2013). Des études complémentaires chez l'Homme doivent cependant être réalisées pour confirmer cette hypothèse.

B.2.3. Transport médié par les *ATP-binding carriers* (ABC)

Les transporteurs actifs primaires, c'est-à-dire qui utilisent directement l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter leur substrat au travers d'une membrane cellulaire, sont appelées les *ATPases*. Ceux-ci sont constitués des *ATPases* de type F, V, A et P ainsi que des transporteurs ABC. Les membres de la famille des ABC possèdent un domaine de liaison et d'hydrolyse de l'ATP, fournissant aux transporteurs l'énergie nécessaire à leur fonctionnement, ce qui les différencie des SLC. Ce domaine, appelé NBD (*nucleotide binding domain*), est hautement conservé entre tous les membres de la famille. Les transporteurs ABC possèdent un très large spectre de substrats allant des petites molécules organiques et inorganiques (acides aminés, sucres, nucléosides, vitamines) à des composés organiques plus larges comme des peptides, des lipides, des oligonucléotides ou encore des polysaccharides (Wilkins, 2015). Chez l'Homme, 48 transporteurs ABC ont été identifiés et sont classés en sept sous-familles, nommées ABC-A à -G (Mahringer and Fricker, 2016). La plupart des transporteurs ABC possèdent une structure similaire, composée de deux domaines à six segments transmembranaires (*transmembrane domains*, TMDs) et de deux domaines NBD ; ils sont appelés "transporteurs complets" (Dean et al., 2001). Le transporteur ABCB1 (P-gp) est un exemple de transporteur complet (Mahringer and Fricker, 2016). Cependant, le nombre de segments transmembranaires et leur longueur en termes d'acides aminés peuvent varier d'un transporteur à l'autre, leur conférant ainsi leur spécificité de liaison vis-à-vis de leurs substrats (Tarr et al., 2009). Certains transporteurs sont des "demi-transporteurs" ; ils ne possèdent qu'un seul lot de TMDs et un seul NBD, et doivent s'homo- ou s'hétéro-dimériser pour être fonctionnels (Dean et al., 2001). Le transporteur ABCG2 (*breast cancer resistance protein*, BCRP) est un exemple de demi-transporteur (Mahringer and Fricker, 2016). Enfin, d'autres transporteurs ont une structure plus originale, comme par exemple les transporteurs ABCC1 et ABCC8 qui possèdent un lot de TMDs supplémentaire ou encore le transporteur ABCC7 qui est le seul à posséder un domaine de régulation appelé *R-domain* (Molinski et al., 2017). Pour la plupart des membres de la famille des ABC, le

transport du substrat semble se faire suivant le modèle de « l'ATP switch » (Higgins and Linton, 2004; Linton, 2007; Wilkens, 2015). Ce modèle suggère que le substrat se lie dans un premier temps aux domaines TMDs, ce qui a pour effet d'augmenter l'affinité des NBDs pour l'ATP. La fixation de l'ATP aux sites NBDs entraîne une dimérisation de ceux-ci et un changement de conformation des TMDs pour permettre le passage du substrat. Enfin, l'hydrolyse de l'ATP provoque la dissociation des NBDs et le retour à l'état basal du transporteur avec libération d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate.

Les transporteurs de quatre sous-familles ; ABCA, ABCB, ABCC et ABCG, ont été identifiés comme jouant un rôle majeur à la BHE (Campos-Bedolla et al., 2014). Ils sont principalement exprimés à la membrane luminale de la BHE, même si certains d'entre eux sont aussi retrouvés à la membrane abluminale des CECCs, ou d'autres cellules de l'UNV comme les astrocytes, les microglies ou les neurones (Mahringer and Fricker, 2016). Au pôle luminal de la barrière, leur fonction est de transporter dans le sens de l'efflux (du cerveau vers le sang) les déchets métaboliques devant être éliminés mais aussi les substances exogènes potentiellement toxiques pour le SNC, d'où leur nom de « pompes d'efflux » (Abbott, 2013; Abbott et al., 2010). Ces pompes sont donc des éléments clés de la BHE pour la protection de l'homéostasie cérébrale. De plus, ils restreignent également la distribution cérébrale de nombreux xénobiotiques ayant pu pénétrer dans la cellule endothéliale par diffusion passive ou par l'intermédiaire d'un SLC (Ohtsuki and Terasaki, 2007). En effet, les transporteurs ABC sont largement impliqués dans le phénomène de résistance multiple aux drogues (*multidrug resistance*, MDR) qui a initialement été décrit pour les molécules anti-cancéreuses (Juliano and Ling, 1976) et qui est également observé pour de nombreux médicaments destinés à traiter des pathologies du SNC (Begley, 2004a; Dallas et al., 2006; Stefková et al., 2004).

ABCB1 (P-gp) et ABCG2 (BCRP), stratégiquement placés au pôle luminal de la BHE, sont les deux pompes d'efflux les plus importantes connues à ce jour pour la protection du cerveau (Abbott et al., 2010; Dauchy et al., 2008; Kamiie et al., 2008). Certaines études suggèrent que les deux transporteurs agissent en synergie (Polli et al., 2009). Ensemble, la P-gp et la BCRP ont le potentiel d'influencer significativement la distribution cérébrale des xénobiotiques (Begley, 2004b).

B.2.3.1. Le transporteur ABCB1 ; Permeability glycoprotein (P-gp)

La P-glycoprotéine (P-gp, ABCB1) est une glycoprotéine de 170 kDa appartenant à la sous-famille ABCB codée par le gène *ABCB1* (ou *MDR1*) chez l'Homme et par les gènes *Mdr1a* et *Mdr1b* chez le rongeur

(Löscher and Potschka, 2005). La P-gp est un transporteur complet, c'est-à-dire qu'il possède deux TMDs et deux NBDs (Sharom, 2014).

La P-gp a été identifiée pour la première fois dans des cellules cancéreuses présentant un phénotype de résistance multiple à différentes drogues de structures variées, appelé phénotype MDR (Juliano and Ling, 1976). Depuis, il a été montré que la P-gp est exprimée de manière physiologique dans de nombreux tissus, en particulier au niveau des cellules épithéliales des tissus excrétoires comme l'intestin, les canalicules biliaires et pancréatiques, le tubule proximal rénal, la glande surrénale ou encore les plexus choroïdes (Cordon-Cardo et al., 1989; Rao et al., 1999; Thiebaut et al., 1987) et au niveau des principales interfaces sang/tissus de l'organisme. En effet, la P-gp a été retrouvée aux barrières hémato-placentaire, hémato-testiculaire et hémato-encéphalique (Beaulieu et al., 1997; Mruk et al., 2011; Vähäkangas and Myllynen, 2009). A la BHE, la P-gp est majoritairement exprimée à la membrane luminale (pôle apical) des CECCs, c'est-à-dire au contact direct du sang circulant (Demeule et al., 2002; Löscher and Potschka, 2005; Schinkel, 1999; Sun et al., 2003), où elle efflue les métabolites cérébraux mais aussi les xénobiotiques potentiellement toxiques ayant pu pénétrer dans la cellule endothéliale. Ainsi, la P-gp joue un rôle important dans la limitation de la distribution cérébrale des xénobiotiques, ce qui peut s'avérer problématique pour le traitement de certaines pathologies du SNC comme par exemple les tumeurs cérébrales. Schinkel et collaborateurs ont réalisé plusieurs études sur des souris déficientes en P-gp (*Mdr1a*^{-/-}) et ont montré que l'accumulation cérébrale de substrats neurotoxiques de la P-gp pouvait être de 10 à 100 fois plus importante que chez des souris contrôles (Schinkel et al., 1994, 1995, 1996). Ces travaux suggèrent que la P-gp joue un rôle très important de protection du cerveau et que toute modulation pathologique de l'expression de la P-gp peut avoir de graves conséquences sur l'homéostasie cérébrale.

Plusieurs centaines de substrats de la P-gp ont été identifiés, et cette liste s'allonge en permanence. Ceux-ci présentent une grande diversité pharmacologique et structurale du fait de la multi-spécificité de reconnaissance de la P-gp (Sanchez-Covarrubias et al., 2014). Cependant, certaines propriétés physico-chimiques semblent être prédictives d'une interaction avec la P-gp. En effet, la majorité de ses substrats sont des molécules neutres ou cationiques, de poids moléculaire variant entre 200 et 1900 Da, possédant souvent des cycles aromatiques, et ayant un caractère plutôt lipophile ou amphiphile (Schinkel and Jonker, 2003). La liste des substrats de la P-gp inclue de nombreux agents anti-cancéreux, mais aussi des antidépresseurs, antihistaminiques, antibiotiques, antiépileptiques, antirétroviraux, immunomodulateurs, corticoïdes et beaucoup d'autres molécules thérapeutiques utilisées en pratique

clinique (Schinkel and Jonker, 2003). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont suggéré une implication de la P-gp dans le transport du peptide A β à la BHE (Cirrito et al., 2005; Kuhnke et al., 2007; Lam et al., 2001; Vogelgesang et al., 2002). Cependant, d'autres études ont montré des résultats différents (Ito et al., 2006; Nazer et al., 2008; Tai et al., 2009) et le rôle de la P-gp dans la clairance cérébrale du peptide A β reste controversé.

Le vérapamil, un inhibiteur calcique, est fréquemment utilisé comme substrat de la P-gp pour mettre en évidence la fonctionnalité du transporteur par exemple, notamment dans les expériences de perfusion cérébrale *in situ* en utilisant le ^3H -vérapamil (vérapamil marqué au tritium)(Chapy et al., 2016; Chaves et al., 2016) ou par TEP *in vivo* en utilisant le ^{11}C -vérapamil (vérapamil marqué au carbone 11) (Luurtsema et al., 2005). Il a aussi été montré que le vérapamil pouvait être, à fortes concentrations, un inhibiteur de la P-gp, ainsi que de trois transporteurs d'influx à la BHE : OCTN-1 et -2 (respectivement SLC22A-4 et -5) et d'un transporteur antiport drogue-protons (Chapy et al., 2015; Koepsell et al., 2007; Sanchez-Covarrubias et al., 2014; Schinkel and Jonker, 2003).

Des inhibiteurs de la P-gp ont été développés dans le but de lutter contre le phénotype de résistance multiple aux agents cytotoxiques (MDR). Le valspodar (ou PSC833), un analogue de la ciclosporine A, est un inhibiteur de la P-gp de deuxième génération. Il possède une haute affinité pour la P-gp mais est transporté et libéré très lentement, ce qui fait de lui un très bon inhibiteur de la P-gp (Smith et al., 1998). De plus, il est efficace à des concentrations beaucoup plus faibles que le vérapamil. Il existe également des inhibiteurs de troisième génération, comme l'elacridar (GF120918) qui est 200 fois plus efficace que le valspodar (Thomas and Coley, 2003). En revanche, l'elacridar inhibe aussi ABCG2 (Bauer et al., 2013; Cisternino et al., 2004; Giri et al., 2009; Sane et al., 2013) et ne pourra donc pas être utilisé pour discriminer l'implication de la P-gp et de la BCRP dans l'efflux d'un xénobiotique par exemple.

B.2.3.2. Le transporteur ABCG2 ; Breast cancer resistance protein (BCRP)

Le transporteur ABCG2 (*breast cancer resistance protein*, BCRP) est également une glycoprotéine membranaire, appartenant à la sous-famille ABCG, et est codé par le gène ABCG2 (Robey et al., 2009). Contrairement à la P-gp, ABCG2 est un demi-transporteur qui doit obligatoirement s'homodimériser, c'est-à-dire s'associer avec un autre demi-transporteur ABCG2 *via* l'établissement de ponts disulfures, pour pouvoir être fonctionnel (Kage et al., 2002; Taylor et al., 2017). En effet, il ne possède qu'un seul TMD et un NBD (Schinkel and Jonker, 2003).

Aucun hétéro-dimère faisant intervenir ABCG2 n'a pour l'instant été identifié. En revanche, certaines études ont montré qu'ABCG2 pouvait s'associer en homo-oligomères pouvant aller jusqu'à l'association de huit monomères d'ABCG2 (McDevitt et al., 2006; Xu et al., 2004). Cependant, le rôle de ces oligomères dans la fonction du transporteur n'a pas encore été élucidé (Ni et al., 2010).

ABCG2 doit son nom de *breast cancer resistance protein* à l'origine de la lignée cellulaire dans laquelle il a été isolé pour la première fois. En effet, ABCG2 a été initialement caractérisé dans une lignée cancéreuse mammaire (lignée MCF-7/AdvVp) présentant un phénotype MDR (résistance à trois molécules anticancéreuses ; la mitoxantrone, la doxorubicine et la daunorubicine) (Doyle et al., 1998). Suite à sa découverte dans les cellules cancéreuses, il a été montré qu'ABCG2 possède une localisation tissulaire similaire à celle de la P-gp dans l'organisme (Maliepaard et al., 2001). Une expression particulièrement élevée a été rapportée au niveau du placenta, des canalicules biliaires, de l'épithélium du colon et de l'intestin, et des capillaires cérébraux (Doyle et al., 1998; Eisenblätter and Galla, 2002; Mao, 2005).

Au niveau de la BHE, ABCG2, de la même façon que la P-gp, a été retrouvé au niveau du pôle apical des CECCs (Cisternino et al., 2004; Cooray et al., 2002). ABCG2 assure l'efflux de nombreuses molécules de nature et de structure différentes, ayant toutefois le point commun de posséder au minimum une région hydrophobe et un motif aromatique (Szafraniec et al., 2014). Le spectre des substrats d'ABCG2 et de la P-gp se recoupent, suggérant une forte coopération de ces deux transporteurs à la membrane luminale de la BHE pour la protection du SNC vis-à-vis des substances endogènes ou des xénobiotiques potentiellement neurotoxiques (Kodaira et al., 2010). Des travaux *in vitro* et *in vivo* de notre équipe ont montré qu'ABCG2 était impliqué dans l'efflux cérébral du peptide A β (Do et al., 2012), en accord avec des résultats obtenus précédemment *in vitro* (Candela et al., 2010; Tai et al., 2009; Xiong et al., 2009).

Ainsi, ABCB1 et ABCG2 sont les membres de la famille des ABC les plus étudiés notamment pour leur rôle physiologique de pompe d'efflux qui est primordial pour la protection du SNC et le maintien de l'homéostasie cérébrale mais également pour leur implication dans la modulation de la pharmacocinétique cérébrale de nombreux médicaments destinés à traiter les maladies du SNC (Cserepes et al., 2004; Mahringer and Fricker, 2016). Enfin, des modifications en termes d'expression et/ou de fonction de ces deux transporteurs ont été décrites dans différentes maladies du SNC comme par exemple dans la MA, la sclérose latérale amyotrophique ou encore l'épilepsie (Qosa et al., 2015).

D'autres transporteurs ABC (notamment ABC-A1, -A2, -G1 et -G4) font l'objet de plus en plus d'études car ils sont suspectés de jouer également un rôle majeur à la BHE, en particulier *via* leur propriété de transport des stérols.

B.2.3.3. Autres transporteurs ABC

ABCA1 et ABCA2 appartiennent à la famille des transporteurs ABCA, dont les membres sont impliqués dans le transport des stérols, phospholipides et acides biliaires (Kaminski et al., 2006; Piehler et al., 2012). Les 12 membres de cette famille présentent une grande homologie de structure. Il s'agit de « transporteurs complets » possédant un domaine régulateur hydrophobe entre leurs deux TMDs, ce qui les différencie des autres transporteurs ABC (Broccardo et al., 1999).

- ABCA1, codé par le gène *ABCA1*, est exprimé dans l'organisme de façon ubiquitaire. Il intervient dans le métabolisme et l'homéostasie du cholestérol. Son rôle principal est d'assurer l'efflux du cholestérol libre intracellulaire vers l'apolipoprotéine A-I plasmatique qui est l'un des constituants majeurs des HDL (Cavelier et al., 2006; Jessup et al., 2006). Des mutations sur le gène *ABCA1* ont été décrites dans la maladie de Tangier qui se caractérise par une accumulation intracellulaire de cholestérol et un déficit en HDL plasmatique (Bodzioch et al., 1999; Brooks-Wilson et al., 1999). ABCA1 transporte également des phospholipides comme par exemple la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine, et probablement des oxystérols (Nagao et al., 2011; Piehler et al., 2012). Aucun xénobiotique n'a pour l'instant été identifié comme substrat d'ABCA1. Dans le SNC, il a été montré qu'ABCA1 est exprimé au niveau de la membrane plasmique des neurones, des astrocytes, des cellules microgliales (Tachikawa et al., 2005; Wellington et al., 2002) mais aussi au pôle luminal des CECCs (Ohtsuki et al., 2004). Do et collaborateurs ont montré chez la souris qu'Abca1 participait, à la BHE, à l'efflux cérébral du cholestérol (Do et al., 2011). De plus, des études sur des modèles murins de MA ont montré qu'Abca1 joue un rôle important dans la régulation des concentrations cérébrales d'ApoE et dans le développement des dépôts amyloïdes (Hirsch-Reinshagen et al., 2005; Koldamova et al., 2005; Wahrle et al., 2005). En effet, la surexpression d'Abca1 a été associée à une diminution de l'accumulation cérébrale de peptide A β ainsi qu'à une diminution de la formation de plaques chez les souris PDAPP, un modèle murin de MA (Wahrle et al., 2008). Une délétion d'Abca1 a été associée, quant à elle, à une augmentation de l'accumulation cérébrale d'A β (Fitz et al., 2012; Hirsch-Reinshagen et al., 2005; Wahrle et al., 2005). Enfin, Akram et collaborateurs ont montré qu'ABCA1 était également augmenté chez les patients atteints de la MA et que son niveau

d'expression était corrélé avec la sévérité de la démence et la densité des plaques amyloïdes et des NFTs (étude *post-mortem* sur échantillons d'hippocampes) (Akram et al., 2010). Ainsi, un lien entre ABCA1 et la MA a été fortement suggéré même si son rôle précis dans la pathogénèse de la maladie n'est pas encore connu (Koldamova et al., 2010).

- ABCA2, codé par le gène *ABCA2*, est également exprimé de façon ubiquitaire. Sa localisation subcellulaire correspond aux endosomes, les lysosomes, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique où il joue un rôle clé dans le métabolisme du cholestérol (Mack et al., 2007). ABCA2 est particulièrement exprimé dans le cerveau. En effet, ABCA2 est le transporteur de la famille ABCA le plus exprimé dans le cerveau, et plus particulièrement dans la substance blanche où il participerait au processus de myélinisation (Zhao et al., 2000). Comme ABCA1, ABCA2 participe au transport et à la régulation de l'homéostasie du cholestérol au niveau du SNC (Mack et al., 2007). Des études portant sur des modèles cellulaires de BHE humaine (hCMEC/D3) ou sur des microvaisseaux isolés humains suggèrent qu'ABCA2 est exprimé à la BHE (Ohtsuki et al., 2004; Shawahna et al., 2011). De plus, il a été montré qu'ABCA2 intervient dans la régulation de la protéolyse de l'APP, et donc dans la production d'A β (Davis, 2010) et qu'un polymorphisme de type SNP a été identifié sur *ABCA2* dans la MA (Macé et al., 2005; Wollmer et al., 2006). Même si les mécanismes moléculaires ne sont pas encore totalement élucidés, un lien a clairement été suggéré entre ABCA2 et la MA (Chen et al., 2004; Davis, 2011).

ABCG1 et ABCG4 appartiennent à la famille des transporteurs ABCG, dont les 5 membres, à l'exception d'ABCG2 (BCRP), jouent un rôle important dans le transport du cholestérol. Ce sont des demi-transporteurs qui doivent obligatoirement s'homo- ou s'hétéro-dimériser pour être fonctionnels. ABCG1 et ABCG4 ont une très forte homologie de structure et ont la capacité de s'hétérodimériser ensemble, comme cela a été montré *in vitro* (Kusuhara and Sugiyama, 2007). Les fonctions biologiques et les substrats d'ABCG1 et ABCG4 ont été beaucoup moins étudiés qu'ABCG2.

- ABCG1, codé par le gène *ABCG1*, est exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme mais est particulièrement retrouvé dans le cœur, le poumon, la rate et les glandes surrénales (Croom et al., 1997; Klucken et al., 2000). Dans le SNC, ABCG1 est principalement exprimé au niveau des neurones et des astrocytes où il est majoritairement localisé en intracellulaire, et à la membrane plasmique. Il participe à l'efflux cellulaire de stérols et du cholestérol vers les particules de HDL extracellulaires (Wang et al., 2004) et à la régulation de l'homéostasie cérébrale du cholestérol

(Tarr and Edwards, 2008; Wang et al., 2008). L'hypothèse d'une collaboration entre ABCA1 et ABCG1 a été suggérée dans la régulation de l'efflux cellulaire du cholestérol (Vaughan and Oram, 2006). La présence d'ABCG1 à la BHE humaine n'est pas connue à ce jour mais sa présence au niveau des CECCs a été mise en évidence sur un modèle cellulaire de BHE bovine (Gosselet et al., 2014) et porcine (Kober et al., 2017).

- ABCG4, codé par le gène *ABCG4*, n'est pas exprimé de façon ubiquitaire. Il est principalement exprimé au niveau du cerveau, du thymus, de l'œil et du poumon (Annino et al., 2001; Oldfield et al., 2002; Wang et al., 2008). Dans le SNC, ABCG4 est co-localisé avec ABCG1, c'est-à-dire au niveau des neurones et des astrocytes, à la membrane plasmique et dans l'appareil de golgi (Tarr and Edwards, 2008). Les substrats d'ABCG4 connus à ce jour sont le cholestérol, le desmostérol et le peptide A β (Do et al., 2012; Dodacki et al., 2017; Vaughan and Oram, 2006; Wang et al., 2008). Les inhibiteurs d'Abcg4 ayant été identifiés sont le probucol, la L-thyroxine, et le desmostérol (Do et al., 2012; Dodacki et al., 2017). Tout comme ABCG1, la présence d'ABCG4 à la BHE humaine n'est pas connue, mais des études de notre laboratoire ont montré qu'Abcg4 est exprimé et fonctionnel à la membrane luminale des CECCs chez la souris, et qu'il participe à l'efflux cérébral du desmostérol et du peptide A β (Do et al., 2012; Dodacki et al., 2017).

L'implication des transporteurs ABCG1 et ABCG4 dans la MA a été suggérée : une surexpression d'ABCG4 a été retrouvée dans les cellules microgliales situées à proximité des plaques séniles chez des patients atteints de la MA (Uehara et al., 2008), et une étude a mis en évidence l'implication de ces deux transporteurs dans la régulation de l'activité de la γ -sécrétase, et donc de la production du peptide A β (Sano et al., 2016).

B.2.4. Transcytose

Les macromolécules comme par exemple les protéines, les peptides, les solutés de haut poids moléculaire ou encore les lipoprotéines, peuvent traverser la BHE par transcytose. Il s'agit d'un mécanisme de transport vésiculaire, c'est-à-dire que la molécule est englobée dans une petite portion de membrane plasmique qui s'invagine, puis s'individualise en une vésicule d'endocytose. Dans le cas particulier des cellules polarisées comme les CECCs, les vésicules peuvent traverser la cellule par migration au travers du cytosol pour libérer la molécule transportée au niveau du pôle opposé de la cellule par exocytose. Le transport peut se faire selon deux mécanismes : la transcytose médiée par

adsorption (*adsorptive-mediated transcytosis*, AMT) ou la transcytose médiée par un récepteur membranaire (*receptor-mediated transcytosis*, RMT) (Abbott et al., 2010).

L'AMT est un phénomène non-spécifique, initié par l'adsorption des macromolécules cationiques (chargées positivement) sur les éléments chargés négativement de la surface des CECCs, par interaction électrostatique (Abbott et al., 2010). L'albumine ou les anticorps mono- et polyclonaux, par exemple, sont transportés à la BHE du sang vers le cerveau par AMT (Hervé et al., 2008; Pardridge et al., 1990).

La RMT est un phénomène de transport spécifique et saturable mettant en jeu des récepteurs membranaires. C'est la liaison spécifique de la macromolécule à son récepteur, présent à la surface des CECCs, qui déclenche l'endocytose. La transferrine ou l'insuline, par exemple, sont transportées à la BHE du sang vers le cerveau par RMT (Banks, 2009; Visser et al., 2004). Parmi les récepteurs impliqués dans des phénomènes de RMT à la BHE, deux ont une importance physiopathologique capitale puisqu'ils sont responsables, entre autres, du transport cérébral du peptide A β ; il s'agit des transporteurs RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) et LRP1 (*low-density lipoprotein receptor related protein 1*).

- RAGE est un récepteur membranaire ubiquitaire et multi-ligand d'environ 35-45 kDa, appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Son large répertoire de ligands inclut les produits de glycation avancés (*advanced glycation endproducts*, AGEs), les médiateurs pro-inflammatoires de la famille S100/calgranuline, la protéine HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*) et le peptide A β (Stern et al., 2002). En conditions physiologiques, l'expression de RAGE est très faible dans tous les tissus mais celle-ci augmente largement en présence de son ligand (Bierhaus and Nawroth, 2009; Bierhaus et al., 2005). Dans le SNC, RAGE est exprimé au niveau des neurones, de la microglie et de la membrane luminale des CECCs où il est le principal transporteur d'influx du peptide A β par transcytose (Candela et al., 2010; Deane et al., 2003). RAGE est surexprimé lorsque le pool d'A β circulant augmente ; une augmentation de son expression a en effet été observée dans les microvaisseaux cérébraux de patients atteints de la MA (Donahue et al., 2006; Jeynes and Provias, 2008). De plus, la liaison de RAGE/ligand entraîne une réponse pro-inflammatoire, pro-coagulante et pro-apoptotique *via* la voie de signalisation du NF- κ B (Cai et al., 2016; Yan et al., 1996).
- LRP1 est aussi un récepteur membranaire ubiquitaire multi-ligand, d'environ 600 kDa et appartenant à la famille des récepteurs aux LDL (Deane et al., 2004b). LRP1 est plus

particulièrement retrouvé dans les hépatocytes, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les neurones et les astrocytes où il est impliqué dans plusieurs processus cellulaires comme la signalisation intracellulaire, le transport et le métabolisme du cholestérol et la clairance de composés extracellulaires par transcytose, bien que le mécanisme exact de transport mis en jeu ne soit pas encore clairement établi (Deane et al., 2004a; Nazer et al., 2008; Shibata et al., 2000). Plus d'une quarantaine de ligands de LRP1 ont été identifiés parmi lesquels des apolipoprotéines comme l'ApoE, des glycoprotéines comme l'A2M (*alpha-2-macroglobulin*), des protéines comme l'APP, des facteurs de coagulation et de croissance, et le peptide A β (Kanekiyo and Bu, 2014; Zlokovic et al., 2010). La localisation exacte de LRP1 à la BHE est controversée. En effet, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré que LRP1 est exprimé au pôle abluminal des CECCs, où il transporte ses substrats, et en particulier le peptide A β , dans le sens de l'efflux (du cerveau vers le sang) (Bell et al., 2007; Deane et al., 2009; Donahue et al., 2006; Ito et al., 2006; Shibata et al., 2000; Storck et al., 2016). D'autres études ont cependant montré que LRP1 n'était pas impliqué dans l'efflux du peptide A β au niveau endothélial (Ito et al., 2010) et qu'il serait exprimé au niveau de la membrane des péricytes plutôt qu'à celle des CECCs (Candela et al., 2015; Gosselet et al., 2009). Ces divergences pourraient provenir de la présence de péricytes dans les préparations de microvaisseaux cérébraux isolés (Candela et al., 2015). Ainsi, LRP1 serait impliqué dans l'internalisation du peptide A β par les péricytes de l'UNV. Ceci suggère que les péricytes pourraient contribuer au métabolisme cérébral du peptide A β , mais leur rôle exact doit encore être investigué (Candela et al., 2015). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse d'une voie d'élimination périvasculaire importante du peptide A β . Quoi qu'il en soit, LRP1 semble jouer un rôle majeur dans le métabolisme cérébral du peptide A β (Candela et al., 2015; Wilhelmus et al., 2007). Par ailleurs, l'expression de LRP1 au niveau de l'UNV a été retrouvée diminuée chez les personnes âgées, les patients atteints de la MA et dans les modèles animaux de MA (Deane et al., 2003; Donahue et al., 2006; Emonard et al., 2014; Shibata et al., 2000; Silverberg et al., 2010).

C. Modifications de l'unité neuro-vasculaire dans la maladie d'Alzheimer

Même si cela n'a pas toujours été le cas, il est dorénavant admis que des anomalies morphologiques et biochimiques de l'unité neuro-vasculaire sont impliquées dans la pathogénèse de la MA (Kalaria, 1992). En effet, des modifications de l'arbre vasculaire cérébral, de l'intégrité physique (c'est-à-dire de la

perméabilité) et fonctionnelle de la BHE (c'est-à-dire des modifications de l'expression et de la fonctionnalité de ses transporteurs) ont été observées chez les patients atteints de la MA (Bell and Zlokovic, 2009).

C.1. Dysfonctions vasculaires

L'idée qu'une dysfonction vasculaire cérébrale puisse jouer un rôle dans le développement de la MA n'est pas nouvelle (Scheibel et al., 1989). Plus récemment, le développement de techniques d'imagerie pointues comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM), et la tomographie par émission de positons (TEP), a permis non seulement de montrer que des modifications neurovasculaires existaient chez les patients atteints de la MA, mais surtout que ces modifications interviennent à un stade précoce du développement de la maladie, en amont du déclin cognitif (Johnson et al., 2005; Montagne et al., 2016; Samuraki et al., 2007). Ces observations confirment que des dysfonctions neurovasculaires s'ajoutent à la cascade amyloïde dans la pathogénèse de la MA (Iadecola, 2004; Kalaria, 2000; Kudo et al., 2000). Berislav Zlokovic propose même une autre hypothèse, appelée « hypothèse neurovasculaire de la maladie d'Alzheimer » remettant en cause l'hypothèse de la cascade amyloïde, comme détaillé dans la partie II) C.4. [L'hypothèse neurovasculaire de la maladie d'Alzheimer](#).

De plus, plusieurs études épidémiologiques ont démontré l'existence d'une corrélation positive entre des facteurs de risque vasculaires comme l'hypertension, le tabac, l'athérosclérose ou l'hypercholestérolémie et le développement de la MA (Hofman et al., 1997; Shah et al., 2012). Nous détaillons ci-dessous les principales anomalies neurovasculaires ayant été observées dans la MA.

C.1.1. Modification de la perfusion cérébrale

La régulation du flux vasculaire cérébral (*cerebral blood flow*, CBF) est primordiale pour assurer un apport régulier en oxygène et en glucose au cerveau. Cette régulation s'effectue grâce à un mécanisme complexe appelé couplage neuro-vasculaire. L'ensemble des cellules de l'unité neuro-vasculaire participent à ce couplage *via* l'envoi de stimuli vasoactifs. En conditions physiologiques, ce mécanisme assure une augmentation rapide et localisée du CBF au niveau des régions cérébrales stimulées (Iadecola, 2004; Kisler et al., 2017). Plusieurs études ont montré que le CBF est globalement diminué de 10 à 25% dans la MA et ce, dès le stade précoce et asymptomatique de la maladie (Binnewijzend et al., 2016; Chao et al., 2010; Johnson et al., 2005). Les régions cérébrales les plus touchées seraient le cortex frontal, pariéto-temporal et cingulaire ainsi que l'hippocampe (Farkas and Luiten, 2001). De plus, la réactivité des vaisseaux cérébraux aux stimuli vasocatifs est également diminuée chez les patients

atteints de démences de type MA. Cette altération du couplage neuro-vasculaire se traduit par une diminution de la réponse des patients aux différentes stimulations cognitives (Cantin et al., 2011). L'altération de la régulation du CBF joue donc un rôle important dans la physiopathologie de la MA.

Il est intéressant de noter que certaines équipes ont montré, par IRM fonctionnelle utilisant un signal dépendant du niveau d'oxygène sanguin (*blood oxygenation level dependent functional magnetic resonance imaging*, fMRI-BOLD), que l'augmentation du CBF en réponse à une stimulation cognitive faisant intervenir la mémoire épisodique était retardée chez les patients atteints de troubles cognitifs légers (*mild cognitive impairment*, MCI). Cela suggère que la modification de la perfusion cérébrale précède l'apparition des biomarqueurs classiques de la MA et pourrait être considérée comme un indicateur de conversion du MCI vers la MA (Hanyu et al., 2010; Hirao et al., 2005; Iturria-Medina et al., 2016).

L'une des hypothèses avancées pour expliquer la réduction du CBF dans la MA serait le déficit ou la perte totale de l'innervation cholinergique des vaisseaux cérébraux (Farkas and Luiten, 2001). En effet, la diminution des neurones cholinergiques est caractéristique de la MA (Muir et al., 1993). Alors que la contribution des voies cholinergiques dans différents processus cognitifs, en particulier la mémoire, a été largement étudiée depuis de nombreuses années, leur implication dans la régulation du CBF a été reconnue plus tardivement (Román and Kalara, 2006). Le système vasodilatateur cholinergique repose sur l'activation de récepteurs cholinergiques muscariniques et nicotiniques (Román and Royall, 1999). Le fonctionnement de ce système diminuant avec l'âge, la capacité de moduler le CBF chez les personnes âgées est altérée et il est très probable que cette altération soit exacerbée par la perte des neurones cholinergiques dans la MA (Román and Kalara, 2006).

Collectivement, ces études montrent qu'une hypoperfusion cérébrale apparaît dès le stade précoce de la pathogénèse de la MA.

C.1.2. Angiopathie amyloïde cérébrale

L'angiopathie amyloïde cérébrale (*cerebral amyloid angiopathy*, CAA) est caractérisée par une accumulation de peptide A β au niveau de la paroi des petites artères cérébrales, plus particulièrement entre la média et l'adventice, ainsi que dans la paroi et autour des vaisseaux et capillaires cérébraux (Vinters et al., 1994). Les dépôts amyloïdes retrouvés dans la CAA se composent de peptide A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂. C'est l'une des lésions vasculaires les plus répandues dans la MA ; elle est retrouvée chez plus de 80%

des patients atteints de la MA (la prévalence peut atteindre 98% selon les études), contre seulement 10 à 40% des personnes âgées saines (Attems et al., 2005; Greenberg et al., 2004; Jellinger, 2002; Kalaria, 2002).

La CAA entraîne, au stade précoce de la MA, un épaissement de la paroi des vaisseaux. Dans un second temps, il peut y avoir dégénérescence des cellules musculaires lisses associant des modifications de type hémodynamiques, des risques de micro-anévrysmes et de nécrose fibrinoïde. Enfin, dans les cas les plus sévères de CAA, il peut y avoir rupture des vaisseaux et apparition de phénomènes hémorragiques (Jellinger, 2002; Masson et al., 2000).

Thomas et collaborateurs ont montré, sur une cohorte de patients diagnostiqués pour la MA, qu'au moins 40% des microvaisseaux des régions du cortex temporal et parahippocampique présentaient des dépôts amyloïdes (Thomas et al., 2000). Il est intéressant de noter qu'une accumulation de peptide $A\beta_{1-40}$ est principalement retrouvée dans les petites artères cérébrales alors que c'est surtout le peptide $A\beta_{1-42}$, plus pathogène, qui est retrouvé dans les capillaires cérébraux, de la même façon que dans les plaques séniles (Roher et al., 1993; Thomas et al., 2000).

Le mécanisme exact conduisant à l'accumulation de peptide $A\beta$ dans la paroi des vaisseaux cérébraux n'est pas tout à fait élucidé mais plusieurs hypothèses ont été formulées. L'une d'elles suggère que les cellules musculaires lisses synthétisent le peptide $A\beta$ en intracellulaire et que celui-ci pourraient s'agréger en extracellulaire sous forme de fibrilles, entraînant ainsi la dégénérescence des cellules musculaires lisses (Coria and Rubio, 1996). Une seconde hypothèse suggère que la CAA est le résultat d'un défaut d'un ou plusieurs mécanismes de clairance cérébrale du peptide $A\beta$ comme par exemple le drainage interstitiel, la dégradation enzymatique ou la transcytose à la BHE (Bell and Zlokovic, 2009; Weller et al., 1998; Yamada and Naiki, 2012).

Quelle qu'en soit la cause exacte, la CAA joue un rôle clé dans la physiopathologie de la MA en perturbant le bon fonctionnement du réseau vasculaire cérébral et favorisant l'hypoperfusion cérébrale chronique (de Figueiredo et al., 1997; Kalaria, 2002; Yamaguchi et al., 1992).

C.1.3. Epaissement de la membrane basale

De nombreuses études ont montré que la membrane basale des microvaisseaux cérébraux s'épaissit avec l'âge. Ce phénomène proviendrait, chez le sujet sain, d'une augmentation de la production ou d'une diminution de la dégradation des constituants de la membrane, à savoir le collagène (qui constitue à lui

seul 50% des protéines retrouvées dans la membrane basale), et plus particulièrement le collagène de type IV, la laminine ou encore les protéoglycanes à sulfate d'héparane (Brown and Thore, 2011; Farkas et al., 2006).

Ce phénomène est particulièrement exacerbé dans la MA (Farkas et al., 2000a; Kalaria, 1992, 2002; Kalaria and Pax, 1995; Mancardi et al., 1980; Morris et al., 2014; Yamashita et al., 1991; Zarow et al., 1997). L'accumulation de peptide A β dans la paroi et autour des capillaires cérébraux pourrait participer à l'exacerbation de ce phénomène par rapport aux sujets âgés sains. Il est intéressant de noter que cet épaississement de la membrane basale a également été retrouvé dans la maladie de Parkinson (Farkas et al., 2000a, 2000b). De plus, un épaississement de la membrane basale avec accumulation de collagène I et IV dans la matrice extracellulaire a été mis en évidence chez les souris 3xTg-AD, un modèle murin triple transgénique de MA avec mutations de l'APP, Tau et PS1 (Bourasset et al., 2009).

L'épaississement de la membrane basale au niveau des microvaisseaux cérébraux nuit fortement aux mécanismes de transport des nutriments et des électrolytes au travers de la BHE et ainsi au bon fonctionnement neuronal. Dans la MA, l'épaississement de la membrane basale participerait donc à la mort neuronale et à l'apparition de déficits cognitifs (Farkas and Luiten, 2001).

C.1.4. Capillaires acellulaires et autres modifications du réseau vasculaire cérébral

Les capillaires acellulaires sont des capillaires ayant perdu leur endothélium et dont il ne subsiste plus que la membrane basale. Ces capillaires ne peuvent alors plus transporter de sang (Brown, 2010). Les capillaires acellulaires peuvent être observés dans le cerveau mais aussi la moelle épinière ou l'œil de sujets sains, et ce à tout âge (Challa et al., 2002). Cependant, leur nombre est largement augmenté dans la plupart des pathologies du SNC, et en particulier dans la MA (Brown and Thore, 2011; Challa et al., 2004; Richard et al., 2010). La disparition du flux vasculaire dans ces capillaires entraîne rapidement leur régression par apoptose puis élimination par phagocytose macrophage-dépendante. Ce phénomène entraîne donc une dégénérescence des capillaires et contribue aux dysfonctions neuronales observées dans la MA (Bailey et al., 2004; Müller et al., 2017).

Les artérioles plongeant dans la substance grise peuvent être extrêmement longs et il arrive qu'ils deviennent « tortueux » chez le sujet âgé, c'est-à-dire qu'ils forment des boucles sur eux-mêmes. De la même façon que les capillaires acellulaires, ces artérioles « tortueuses » peuvent être observées chez le

sujet sain, en particulier après 70 ans, mais sont beaucoup plus nombreuses dans la MA (Bailey et al., 2004; Miyakawa et al., 1988). La « tortuosité » de ces artérioles ou vaisseaux augmente leur longueur de sorte qu'à pression sanguine constante, le flux sanguin cérébral est diminué (Moody et al., 1991).

Enfin, d'autres altérations de la microvascularisation cérébrale ont été décrites dans la MA comme la diminution de la densité des capillaires et du volume vasculaire cérébral, des irrégularités de la surface des capillaires, des modifications du diamètre des vaisseaux ou encore la fragmentation des vaisseaux avec notamment une diminution du nombre de branches intactes (Bailey et al., 2004; Brown et al., 2007; Buée et al., 1994; Farkas and Luiten, 2001; Fischer et al., 1990; Zlokovic, 2008).

Collectivement, toutes ces altérations de la microvascularisation jouent un rôle capital dans la pathogénèse de la MA en diminuant l'approvisionnement du cerveau en nutriments et substances essentielles à son fonctionnement, compromettant ainsi l'homéostasie cérébrale. Ces phénomènes apparaissent de façon précoce dans le développement de la maladie, précédant la mort neuronale (Farkas and Luiten, 2001; Müller et al., 2017; Zlokovic, 2008).

C.2. Modifications de l'intégrité physique de la barrière hémato-encéphalique

L'hypothèse d'une augmentation de la perméabilité de la BHE, c'est-à-dire une augmentation du passage de protéines et autres molécules circulantes potentiellement neurotoxiques au travers de la barrière, chez les patients atteints de la MA a été proposée depuis longtemps. Cela fait plus de 30 ans que l'intégrité de la BHE ainsi que son implication dans différentes pathologies du SNC sont intensivement étudiées. En effet, une altération, même transitoire et/ou localisée de l'intégrité de la BHE peut avoir des conséquences dramatiques sur l'homéostasie cérébrale et le bon fonctionnement neuronal en favorisant l'apparition de neuroinflammation, stress oxydatif ou encore de neurotoxicité. Ainsi, il a été envisagé que la modification du phénotype de barrière pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse de la MA (Claudio, 1996; Heyman et al., 1998; Wisniewski and Kozlowski, 1982). Cependant, si la présence d'une altération de l'intégrité physique de la BHE a été facilement démontrée en cas d'accident vasculaire cérébral ou dans la sclérose en plaques, celle-ci est restée, jusqu'à présent, très controversée dans la MA (Erickson and Banks, 2013; Farrall and Wardlaw, 2009). Plus d'études sont donc nécessaires pour pouvoir se prononcer avec certitude sur l'intégrité physique de la BHE dans la MA.

En clinique, l'intégrité de la BHE a classiquement été étudiée selon trois procédures ; le rapport LCR/sérum de l'albumine, l'examen histologique du cerveau et l'imagerie médicale (Erickson and Banks, 2013). Devant les nombreuses difficultés liées à l'étude de la BHE humaine, une grande quantité d'études ont été réalisées sur des modèles animaux de MA.

C.2.1. Rapport d'albumine LCR/sérum

L'albumine est une protéine endogène produite par le foie d'environ 70 kDa, présente en grande quantité dans le sang circulant. En conditions physiologiques, l'albumine ne passe pas, ou très peu, la BHE, et ne doit donc pas être retrouvée dans le cerveau. Tibbing et collaborateurs ont été les premiers à proposer l'utilisation du rapport d'albumine LCR/sérum (Tibbling et al., 1977). Ils suggèrent que si les concentrations circulantes d'albumine se trouvent dans les valeurs de référence, alors toute augmentation de la concentration en albumine dans le LCR est principalement due à une augmentation de la perméabilité de la BHE. Les résultats obtenus chez des patients atteints de la MA avec cette méthode sont extrêmement fluctuants. En effet, de nombreuses études ont montré une augmentation du rapport d'albumine LCR/sérum (Algotsson and Winblad, 2007; Blennow et al., 1990; Elovaara et al., 1985; Skoog et al., 1998; Wada, 1998), mais presque autant d'études montrent qu'aucune modification du rapport n'est retrouvée dans la MA (Frölich et al., 1991; Kay et al., 1987; Mecocci et al., 1991). Ces disparités peuvent avoir plusieurs sources. D'une part, certaines de ces études ne différencient pas les patients atteints de la MA de ceux atteints de démences vasculaires, or ces deux catégories de patients ont montré des caractéristiques de la BHE différentes (Dickstein et al., 2010). D'autre part, le choix du groupe contrôle peut influencer la conclusion de l'étude. Choisir comme groupe contrôle une population jeune et saine ou une population plus âgée, dont l'intégrité de la BHE peut être modulée par l'existence d'autres pathologies, va produire respectivement une surestimation ou une sous-estimation de l'élévation du rapport d'albumine LCR/sérum chez les patients atteints de la MA (Erickson and Banks, 2013). Enfin, cette technique ne permet pas de différencier la BHE de la BHL, au travers de laquelle l'albumine pourrait également passer dans le LCR, indépendamment de la BHE, d'autant que le renouvellement du LCR est fortement diminué chez le sujet âgé, ce qui augmente artificiellement le niveau d'albumine dans le LCR (Brettschneider et al., 2005; Chen, 2011; Farrall and Wardlaw, 2009). Ainsi, le rapport d'albumine LCR/sérum ne semble pas être un indicateur fiable de l'intégrité physique de la BHE.

C.2.2. Examen histologique

La plupart des études histologiques retrouvées dans la littérature reposent sur un marquage immunohistochimique (IHC) *post-mortem* de protéines ou peptides circulants comme l'albumine et la préalbumine, les IgG, la prothrombine ou le fibrinogène. Cette technique repose sur le principe que ces molécules ne sont pas synthétisées dans le SNC et qu'elles peuvent donc être des marqueurs indirects de l'étanchéité de la BHE. Comme pour le rapport d'albumine LCR/sérum, certains auteurs ont réussi à mettre en évidence un marquage IHC de protéines circulantes sur des coupes de cerveaux de patients (Alafuzoff et al., 1983; Berzin et al., 2000; Zipser et al., 2007), alors que d'autres ne l'ont pas observé (Alafuzoff et al., 1987; Tomimoto et al., 1996). Là encore, des explications ont été proposées pour expliquer cette disparité dans les résultats. Rozemuller et collaborateurs ont par exemple mis en évidence une augmentation de la coloration IHC par fixation du tissu au formaldéhyde par rapport aux échantillons congelés (Rozemuller et al., 1988). Ainsi, l'analyse histologique *post-mortem* de coupes de cerveaux provenant de patients ne semble pas non plus être suffisamment fiable pour révéler une altération de l'intégrité physique de la BHE dans la MA.

C.2.3. Imagerie médicale

Des études utilisant différentes techniques d'imagerie médicale ont essayé de mettre en évidence une altération de la BHE chez l'Homme, sans réel succès. Jusqu'à présent, aucune étude, parmi les deux études de tomодensitométrie (Caserta et al., 1998; Dysken et al., 1990), l'étude de TEP utilisant l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (Schlageter et al., 1987) et les trois études d'IRM (Bronge and Wahlund, 2000; Starr et al., 2009; Wang et al., 2006), n'ont réussi à révéler de modification significative de la perméabilité de la BHE dans la MA. Ces techniques d'imagerie n'ont cependant pas une résolution suffisante pour imager directement les jonctions serrées. Il serait donc intéressant d'utiliser des techniques plus pointues comme la microscopie électronique ou la microscopie de super-résolution pour examiner plus précisément l'organisation et la morphologie des jonctions serrées dans la MA (Erickson and Banks, 2013; Luissint et al., 2012a).

Aux vues des difficultés techniques rencontrées lors de l'exploration de l'intégrité de la BHE chez l'Homme, les travaux se sont concentrés sur l'étude de l'intégrité de la BHE dans les modèles animaux (murins) de la MA.

C.2.4. Etudes des modèles animaux

Ujiie et collaborateurs furent les premiers à étudier l'intégrité physique de la BHE dans un modèle murin de MA en mesurant le passage cérébral d'un colorant ; le bleu Evans. Lorsqu'il est injecté en IV, le bleu Evans se lie à l'albumine présente dans le sang et son passage dans le cerveau devient alors un marqueur de l'intégrité physique de la BHE. Ils ont ainsi mis en évidence une augmentation de la perméabilité de la BHE dans le cortex de souris Tg2576, un modèle murin de surexpression de l'APP humaine et ce, en amont du développement des plaques amyloïdes (Ujiie et al., 2003). Ces résultats ont été confirmés par une autre équipe chez les souris Tg2576 ainsi que dans deux autres modèles murins transgéniques de surexpression de l'APP humaine (TgCRND8 et PDAP) (Paul et al., 2007).

Biron et collaborateurs ont utilisé une autre méthode pour mettre en évidence une diminution de l'intégrité de la BHE chez les souris Tg2576. Ils ont montré par imagerie confocale que les protéines des JSs (occludine et ZO-1) présentes entre les CECCs de ces souris présentaient une anomalie morphologique dans les régions du cortex et de l'hippocampe et ont conclu que cette perturbation des JSs pourrait expliquer l'augmentation de la perméabilité de la BHE dans la MA (Biron et al., 2011). Ces résultats sont en accord avec les résultats d'une autre étude ayant montré une diminution de l'expression de l'occludine à la BHE de souris APP/PS1 (Takechi et al., 2008).

Enfin, Kook et collaborateurs ont exploré l'intégrité de la BHE de souris 5XFAD, un modèle murin transgénique exprimant cinq mutations familiales de la MA (FAD) sur APP et PS1, par deux techniques d'imagerie. Ils ont montré, grâce à la microscopie de super résolution en illumination structurée (*structured illumination microscopy*, SIM) et en utilisant Glut1 comme marqueur endothélial, que les capillaires cérébraux des souris 5XFAD étaient altérés et que ces altérations étaient co-localisées avec les plaques amyloïdes. Ils ont également mis en évidence par microscopie électronique une anomalie morphologique des JSs chez les souris 5XFAD par rapport aux contrôles. Celles-ci présentent des JSs plus courtes, ce qui suppose une altération de l'intégrité de leur BHE. Ces résultats sont en accord avec les études *in vitro* réalisées par la même équipe sur une lignée de cellules endothéliales cérébrales de souris (bEnd.3), dans laquelle ils ont mis en évidence qu'une exposition au peptide A β entraînait une diminution de l'expression et une altération de la structure de trois protéines des JSs (occludine, ZO-1 et claudine-5), ainsi qu'une augmentation de la diffusion du FITC-dextran 40 (FD-40, utilisé pour mesurer la perméabilité de la BHE). Ainsi, Kook et collaborateurs ont conclu que l'accumulation du peptide A β était responsable d'une altération des JSs et d'une augmentation de la perméabilité de la BHE chez les souris 5XFAD (Kook et al., 2012, 2013).

Cependant, d'autres études n'aboutissent pas aux mêmes conclusions. Des chercheurs de notre équipe ont utilisé la technique de perfusion cérébrale *in situ* (PCIS) (Dagenais et al., 2000; Takasato et al., 1984) pour étudier l'intégrité de la BHE dans deux modèles murins de MA. Cette technique permet d'étudier *in vivo* le passage d'une molécule au travers de la BHE. Les intérêts de cette technique sont d'une part que la concentration de la molécule perfusée, le temps de perfusion ainsi que le flux de perfusion sont parfaitement contrôlés, d'autre part que les différentes ligatures permettent de s'assurer que 100% de la quantité de molécule d'intérêt atteint la BHE, et enfin que l'on s'affranchit de tout métabolisme périphérique. La perfusion d'un marqueur vasculaire (généralement le saccharose marqué au tritium), qui ne franchit pas la BHE pendant un temps de perfusion court, permet de mesurer avec précision l'intégrité de la BHE *via* le calcul du volume de l'espace vasculaire cérébral appelé V_{vasc} . La BHE est considérée intacte si le V_{vasc} est inférieur à 20 $\mu\text{L/g}$ (Cattelotte et al., 2008). Grâce à cette technique, Do et collaborateurs ont montré qu'il n'y avait pas d'augmentation de la perméabilité de la BHE chez les souris APP/PS1 (Do et al., 2014), en accord avec les résultats précédemment obtenus par Poduslo et collaborateurs (Poduslo et al., 2001). De la même façon, Alata et collaborateurs n'ont pas montré de modification de la perméabilité de la BHE chez les souris APOE4, un modèle murin de prédisposition génétique à la MA (Alata et al., 2015). En revanche, une diminution du volume vasculaire a été observée chez les souris 3xTg-AD à partir de 8 mois, sans modification de la surface d'échange entre le sang et le parenchyme cérébral (Bourasset et al., 2009; Do et al., 2014). La surface d'échange sang/parenchyme cérébral peut être mesurée par la technique de PCIS en utilisant un marqueur de diffusion passive comme le diazépam par exemple. Les auteurs ont montré que, dans ce modèle, la diminution du volume vasculaire est associée à l'épaississement de la lame basale par accumulation de collagène, ce qui pourrait être à l'origine d'un rétrécissement de la lumière des microvaisseaux (Do et al., 2014).

Ainsi, bien que l'augmentation de la perméabilité de la BHE soit suspectée dans la MA, et observée dans certains modèles animaux, les mécanismes sous-jacents à cette perte d'intégrité ne sont pas encore élucidés. L'une des hypothèses les plus étudiées fait intervenir le peptide A β . La liaison de celui-ci au récepteur RAGE provoquerait une augmentation des concentrations intracellulaires de calcium, ce qui causerait la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et de métalloprotéases matricielles (*matrix metalloproteinases*, MMPs), et aboutirait à une toxicité vis-à-vis des CECCs et une altération des JSs, et pour finir, à la perte de l'intégrité de la BHE (Carrano et al., 2011; Kook et al., 2012). Cependant, les résultats des études de Do et collaborateurs, Poduslo et collaborateurs et Alata et collaborateurs dans lesquelles aucune augmentation de la perméabilité de la BHE n'est observée chez des souris pour

lesquelles il y a bien une accumulation de peptide A β , remettent cette hypothèse en cause. Ces études suggèrent que d'autres éléments de la physiopathologie de la MA pourraient alors avoir un rôle prépondérant dans l'altération de l'intégrité de la BHE, comme par exemple la protéine Tau.

C.3. Modifications de l'intégrité fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique

C.3.1. Transport du glucose

Chez l'Homme, à l'état éveillé et au repos, le cerveau consomme à lui seul 25% du glucose circulant. Le glucose est le substrat énergétique essentiel et prédominant du métabolisme cérébral en conditions physiologiques. Un hypométabolisme cérébral du glucose est retrouvé dans la MA et constitue l'une des caractéristiques physiopathologiques principales de la MA (Chen and Zhong, 2013). La diminution du métabolisme cérébral du glucose a été observée dans la MA grâce à l'imagerie TEP et à l'utilisation du traceur ^{18}F -FDG. Le FDG est en effet le traceur le plus adéquat pour l'étude du métabolisme du glucose car il simule à la fois son transport cérébral et les premières étapes de la glycolyse. Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence une diminution précoce du métabolisme du glucose dans la MA, corrélée avec la gravité des symptômes cliniques (Landau et al., 2011; Li et al., 2008; Mosconi, 2005; Mosconi et al., 2008).

Le métabolisme du glucose est un processus faisant intervenir plusieurs étapes dont la première est le transport au travers de la BHE *via* GLUT1. Une diminution de l'expression du transporteur GLUT1 au niveau de l'endothélium des microvaisseaux cérébraux a été retrouvée chez les patients atteints de la MA, mais sans diminution de l'expression de l'ARNm correspondant (Campos-Bedolla et al., 2014; Horwood and Davies, 1994; Kalaria and Harik, 1989; Mooradian et al., 1997). Cette diminution est susceptible d'avoir des conséquences dramatiques sur l'homéostasie cérébrale et les fonctions cognitives, et donc de jouer un rôle dans la pathogénèse de la MA.

L'étude du transport du glucose par PCIS dans les modèles murins de MA a en revanche, fourni des résultats plus hétérogènes. Une diminution de l'expression du transporteur Glut1 à la BHE (Hooijmans et al., 2007b), mais sans modification du transport cérébral du glucose (Do et al., 2014), a été observée chez les souris APP/PS1. Une diminution tardive (à 18 mois) du transport cérébral du glucose, accompagnée d'une diminution de l'expression du transporteur, a été observée chez les souris 3xTg-AD (Do et al.,

2014). Enfin, une diminution du transport cérébral du glucose, mais sans modification de l'expression du transporteur, a été observée chez les souris APOE4 (Alata et al., 2015).

Ainsi l'expression et l'activité de GLUT1 sont diminuées chez le patient atteint de la MA et dans certains modèles murins de MA. Les raisons de ce déclin ne sont pas encore complètement élucidées mais la principale hypothèse est que celle-ci intervient en réponse à la diminution de la demande métabolique du cerveau (Erickson and Banks, 2013; Harik and Kalara, 1991; Vannucci et al., 1998). Cependant, le fait que l'ARNm de GLUT1 ait été retrouvé inchangé chez les patients atteints de la MA, indique que cette hypothèse est incomplète et que d'autres éléments pourraient intervenir dans la régulation de l'expression de GLUT1 dans la MA comme par exemple des facteurs pro-inflammatoires (Simpson and Vannucci, 2002).

C.3.2. Transport du peptide A β

Comme évoqué précédemment, les principaux transporteurs impliqués dans le passage du peptide A β au travers de la BHE sont le transporteur RAGE et possiblement OATP1A2 dans le sens de l'influx (du sang vers le cerveau) et le récepteur LRP1 et les transporteurs P-gp, BCRP et ABCG4 dans le sens de l'efflux (du cerveau vers le sang). Il a été montré que la clairance du peptide A β est 30% moins efficace chez un patient atteint de la MA que chez un sujet sain (Mawuenyega et al., 2010), et l'implication de la BHE dans ce phénomène a été suggérée (Sagare et al., 2013).

L'expression du récepteur RAGE à la BHE a été retrouvée augmentée dans la MA (Donahue et al., 2006; Jeynes and Provias, 2008; Miller et al., 2008; Yan et al., 1996). Des résultats similaires ont été observés chez les souris 3xTg-AD (Do et al., 2016) et APOE4 (Alata et al., 2015). Le mécanisme conduisant à l'augmentation du récepteur RAGE dans la MA n'est pas encore élucidé d'autant que RAGE, à la différence de LRP1, n'est pas co-localisé avec les plaques amyloïdes (Donahue et al., 2006).

Oatp1a4, suspecté de participer à l'influx cérébral du peptide A β , n'a pas été retrouvé modifié chez les souris 3xTg-AD (Do et al., 2016). Aucune information n'est disponible pour OATP1A2 chez l'Homme pour le moment.

L'expression du récepteur LRP1 à la BHE a été retrouvée diminuée dans la MA (Donahue et al., 2006; Jeynes and Provias, 2008; Shibata et al., 2000). Une diminution de l'expression de Lrp1 a également été observée chez les souris 3xTg-AD à 18 mois (Do et al., 2016), mais pas chez les souris APOE4 (Alata et al., 2015).

Une corrélation négative a également été observée entre la densité des plaques séniles et les niveaux d'expression de la P-gp à la BHE chez les patients atteints de la MA (Vogelgesang et al., 2002). De plus, une étude d'imagerie TEP utilisant le ^{11}C -vérapamil, un substrat connu de la P-gp, a montré une diminution de la fonctionnalité de la P-gp à la BHE de patients comparée à celle de contrôles sains (van Assema et al., 2012). Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro*. Par exemple, une diminution de 60% de l'expression de la P-gp a été mesurée sur des capillaires isolés provenant de souris Tg2576 (Hartz et al., 2010). En revanche, une augmentation de l'expression de la P-gp a été retrouvée chez les souris 3xTg-AD à 18 mois (Do et al., 2016).

Les mécanismes sous-jacents à cette régulation de LRP1 et P-gp ne sont pas précisément connus mais plusieurs équipes ont émis l'hypothèse que le peptide A β pourrait réguler négativement l'expression de ses transporteurs d'efflux par fixation à son récepteur d'influx RAGE et activation de la voie pro-inflammatoire RAGE-NF κ B (Brenn et al., 2011; Deane et al., 2004a; Park et al., 2014).

L'expression des autres transporteurs ABC impliqués dans l'efflux du peptide A β est également modulée. L'expression et/ou la fonctionnalité des transporteurs BCRP et ABCG4 ont notamment été retrouvées augmentées chez des patients atteints de la MA (Uehara et al., 2008; Xiong et al., 2009). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans le modèle 3xTg-AD avec une augmentation de l'expression d'ABCG4 et de la Bcrp respectivement à 3 mois et à 18 mois (Do et al., 2016). Cela suggère qu'un mécanisme compensatoire initié par l'environnement pathologique de l'UNV se met en place à la BHE pour s'opposer à l'accumulation cérébrale du peptide A β et limiter la pénétration cérébrale du peptide A β circulant (Xiong et al., 2009). Il est cependant intéressant de noter que Wijesuriya et collaborateurs n'ont pas montré de différence d'expression de la BCRP entre des patients atteints de la MA et des contrôles sains (Wijesuriya et al., 2010). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre l'impact des modulations dont font l'objet les transporteurs ABC dans la MA.

En conclusion, une augmentation de l'influx cérébral du peptide A β (*via* RAGE) est observé dans la MA. Concernant l'efflux, deux mécanismes distincts se dessinent, avec une diminution de l'expression de LRP1 et de la P-gp et une augmentation de l'expression de la BCRP et d'ABCG4. Les modulations de RAGE, de LRP1 et de la P-gp sont présentées comme participant à l'exacerbation de l'accumulation du peptide A β et à la formation des plaques séniles dans l'hypothèse neurovasculaire de la MA (voir partie II) [C.4. L'hypothèse neurovasculaire de la maladie d'Alzheimer](#)). Cependant, l'implication de la P-gp dans le transport du peptide A β est controversée, tout comme la localisation vasculaire de LRP1. Ainsi, les

modulations de l'expression de la BCRP et d'ABCG4 pourraient correspondre à un mécanisme de défense contre l'accumulation cérébrale d'A β , mis en place par la BHE lors d'un processus neurodégénératif. D'autres études sont nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Quoi qu'il en soit, la modulation des récepteurs et transporteurs impliqués dans le transport du peptide A β au travers de la BHE semble jouer un rôle critique dans la pathogénèse de la MA (Erickson and Banks, 2013; Sagare et al., 2013).

C.3.3. Transport du cholestérol

Comme évoqué précédemment, les principaux transporteurs impliqués dans l'efflux cérébral du cholestérol seraient ABCA1, ABCA2, ABCG1 et ABCG4. Parmi eux, seuls ABCA1 et ABCA2 ont été identifiés avec certitude à la BHE chez l'Homme (Ohtsuki et al., 2004; Shawahna et al., 2011). Aucun transporteur d'influx du cholestérol à la BHE n'a été décrit à ce jour.

L'expression d'ABCA1 a été retrouvée augmentée dans l'hippocampe chez des patients atteints de la MA (analyse d'échantillons *post-mortem*) (Akram et al., 2010; Kim et al., 2010). Une étude a révélé que la surexpression d'ABCA1 était corrélée au degré de sévérité de la démence (Akram et al., 2010). Une augmentation de l'expression d'Abca1 a également été observée dans les CECCs dès 3 mois chez les souris 3xTg-AD, associée à une augmentation de l'efflux cérébral du cholestérol (Do et al., 2016).

ABCA2 et ABCG1 sont actuellement intensivement étudiés par rapport à leur rôle potentiel dans la MA (Davis, 2015; Sano et al., 2016), mais aucune information n'est encore disponible quant à leur expression et fonctionnalité à la BHE dans la MA.

Enfin, l'expression d'ABCG4 a été retrouvée augmentée dans les cellules microgliales situées à proximité des plaques séniles chez des patients atteints de la MA (analyse d'échantillons *post-mortem*) (Uehara et al., 2008). Une augmentation de l'expression d'Abcg4 a été observée dans les CECCs, à 3 mois uniquement, chez les souris 3xTg-AD (Do et al., 2016).

Plus d'études sont donc nécessaires pour confirmer dans un premier temps l'expression et la fonctionnalité de ces transporteurs à la membrane luminale des CECCs chez l'Homme et leur rôle dans l'efflux cérébral du cholestérol. Dans un second temps, il serait intéressant d'étudier les modulations de l'expression de ces transporteurs, au niveau de la BHE spécifiquement, dans la MA. Ces résultats permettraient de mieux comprendre l'implication des transporteurs ABC dans l'efflux du cholestérol à la BHE (et donc dans l'homéostasie cérébrale du cholestérol) et dans la pathogénèse de la MA.

C.3.4. Le transport des acides aminés essentiels

Il serait également intéressant d'étudier le transporteur LAT1 du fait du rôle important des LNAAs dans la synthèse protéique et des neurotransmetteurs au niveau du SNC. Malheureusement, aucune étude n'a pour le moment exploré les modulations d'expression et/ou de fonctionnalité de ce transporteur à la BHE dans la MA.

C.4. L'hypothèse neurovasculaire de la maladie d'Alzheimer

Il devient de plus en plus évident que des modifications de la microvascularisation cérébrale sont associées au processus neurodégénératif et qu'elles jouent un rôle important dans la MA (Montagne et al., 2015, 2016; Snyder et al., 2015; Zlokovic, 2011). L'hypothèse neurovasculaire de la MA se distingue de l'hypothèse de la cascade amyloïde en proposant que l'altération de la microvascularisation cérébrale soit l'élément initial de la cascade pathologique de la MA, et qu'elle favorise en particulier l'accumulation de peptide A β au niveau cérébral (Nelson et al., 2016; Zlokovic, 2005, 2011). Une représentation schématique de l'hypothèse neurovasculaire de la MA a été proposée (**figure 2**) :

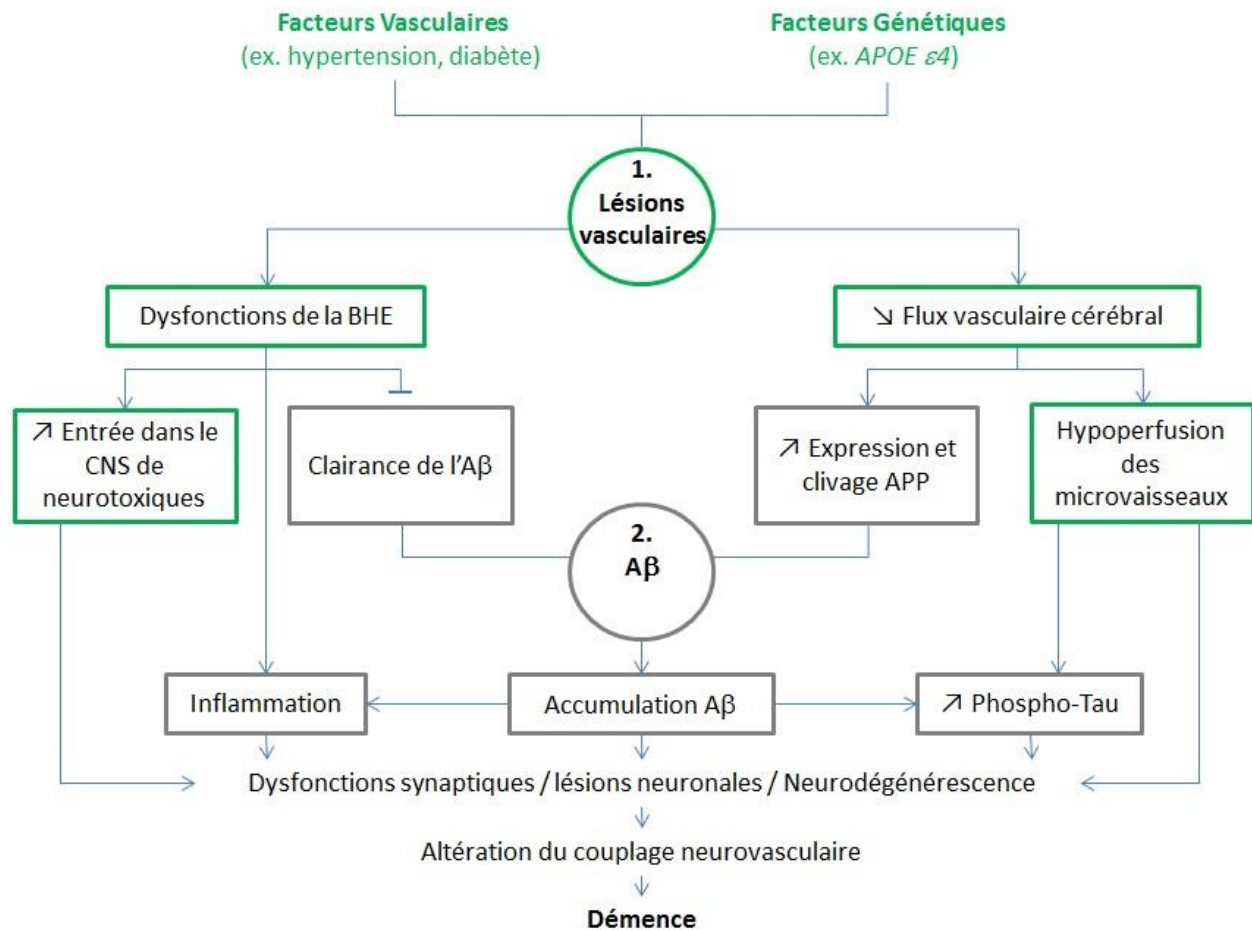


Figure 2 : Représentation schématique de l'hypothèse neurovasculaire de la maladie d'Alzheimer [Adapté d'après (Nelson et al., 2016)].

Comme nous l'avons évoqué précédemment, certains facteurs génétiques, pathologiques ou encore environnementaux ont été identifiés comme facteurs de risques de la MA (voir partie I) **B.3. Les facteurs de risque**). Parmi eux, les facteurs de risque vasculaires, comme par exemple l'hypertension artérielle, l'athérosclérose, le diabète, l'hypercholestérolémie, les traumatismes cérébraux ou les AVC, ainsi que l'allèle *APOE ε4* seraient à l'origine d'une altération neurovasculaire avec, selon les cas, une diminution du débit de perfusion cérébral (diminution du CBF) (Iadecola, 2013; Roher et al., 2012) et hypométabolisme cérébral (Chen and Zhong, 2013) et/ou une augmentation de la perméabilité de la BHE et augmentation de l'entrée dans le CNS de substances potentiellement neurotoxiques (Montagne et al., 2015; Ryu and McLarnon, 2009; Zipser et al., 2007). Cette modification de la microvascularisation cérébrale serait donc l'élément initial capable d'induire directement des lésions neuronales et synaptiques ainsi qu'une neurodégénérescence; il s'agit de la voie indépendante de l'Aβ (voie 1, en vert sur la **figure 2**).

L'altération neurovasculaire pourrait également induire, *via* différents mécanismes, une accumulation cérébrale de peptide A β , contribuant également aux lésions caractéristiques de la MA ; il s'agit de la voie dépendante de l'A β (en gris sur la **figure 2**). En effet, comme nous l'avons décrit dans la partie II) C.3.2. **Transport du peptide A β** , des études ont mis en évidence d'une part, une diminution significative de l'expression du récepteur LRP1 et de la P-gp, tous deux potentiellement impliqués dans la clairance cérébrale du peptide A β , et d'autre part une augmentation de l'expression de RAGE, impliqué dans l'influx cérébral du peptide A β , au niveau de la BHE dans la MA (van Assema et al., 2012; Donahue et al., 2006). Ces modifications fonctionnelles de la BHE participeraient à l'accumulation cérébrale du peptide A β . De plus, des mutations sur les gènes codant pour le précurseur du peptide amyloïde et les présénilines 1 et 2 favorisent la voie amyloïdogénique du métabolisme de l'APP, et provoquent également une accumulation cérébrale de peptide A β , mais uniquement dans les formes familiales de la MA. Enfin, l'augmentation des concentrations cérébrales de peptide A β entraîneraient ensuite, de la même façon que dans l'hypothèse de la cascade amyloïde, la formation des plaques séniles et des NFTs, une neuroinflammation, une perte neuronale et synaptique, le tout aboutissant au déclin cognitif et à la démence (Selkoe and Hardy, 2016).

Cette hypothèse, impliquant la BHE dans la pathogénèse de la MA semble plus physiologique que celle de la cascade amyloïde. Il semble donc important de s'intéresser aux modifications de l'intégrité physique et fonctionnelle de la BHE en conditions pathologiques pour mieux comprendre la pathogénèse de la MA. Néanmoins, certains éléments importants, ayant été mis en évidence à la BHE de patients atteints de la MA, ne sont pas pris en compte dans cette hypothèse. Nous pouvons citer par exemple l'augmentation de l'expression des transporteurs BCRP et ABCG4 (Uehara et al., 2008; Xiong et al., 2009), impliqués dans l'efflux cérébral du peptide A β , ou encore la perméabilité de la BHE que plusieurs études n'ont pas retrouvée significativement augmentée (Caserta et al., 1998; Starr et al., 2009; Tomimoto et al., 1996; Wang et al., 2006).

C.5. Bilan des modifications de l'unité neuro-vasculaire dans la maladie d'Alzheimer

Type de modification		Sens de la modification	Principales références
➤ Pathologie vasculaire			
Perfusion cérébrale (CBF)		↘	(Farkas and Luiten, 2001; Hanyu et al., 2010; Hirao et al., 2005; Iadecola, 2004; Kisler et al., 2017)
Dépôts amyloïdes vasculaires (CAA)		↗	(Attems et al., 2005; de Figueiredo et al., 1997; Greenberg et al., 2004; Roher et al., 1993; Weller et al., 1998)
Epaisseur de la paroi vasculaire		↗	(Bell and Zlokovic, 2009; Farkas and Luiten, 2001; Farkas et al., 2000a; Kalaria, 1992; Kalaria and Harik, 1989; Kalaria and Pax, 1995; Mancardi et al., 1980; Morris et al., 2014; Zarow et al., 1997)
Capillaires acellulaires et autres modifications		NA	(Bailey et al., 2004; Brown and Thore, 2011; Challa et al., 2004; Farkas and Luiten, 2001; Müller et al., 2017; Richard et al., 2010; Zlokovic, 2008)
➤ Intégrité physique			
Perméabilité de la BHE		↗ ou ↔	(Claudio, 1996; van de Haar et al., 2016a, 2016b; Müller et al., 2017; Wardlaw et al., 2003; Zipser et al., 2007; Zlokovic, 2011)
➤ Intégrité fonctionnelle			
Transport du glucose	GLUT1 (sang → cerveau)	↘	(Campos-Bedolla et al., 2014; Horwood and Davies, 1994; Kalaria and Harik, 1989; Mooradian et al., 1997)
Transport du peptide Aβ	RAGE (sang → cerveau)	↗	(Donahue et al., 2006; Jaynes and Provias, 2008; Miller et al., 2008; Yan et al., 1996)
	OATP1A2 (sang → cerveau)	?	-
	LRP1 (cerveau → sang)	↘	(Donahue et al., 2006; Jaynes and Provias, 2008; Shibata et al., 2000)
	P-gp (cerveau → sang)	↘	(van Assema et al., 2012; Vogelgesang et al., 2002; Wijesuriya et al., 2010)
	BCRP (cerveau → sang)	↗	(Xiong et al., 2009)
	ABCG4 (cerveau → sang)	↗	(Uehara et al., 2008)
Transport du cholestérol	ABCA1 (cerveau → sang)	↗	(Akram et al., 2010; Kim et al., 2010)
	ABCA2 (cerveau → sang)	?	-
	ABCG1 (cerveau → sang)	?	-
	LAT1	?	-

Tableau 4 : Tableau bilan des modifications vasculaires et de la barrière hémato-encéphalique observées chez le patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

L'ensemble des données présentées ci-dessus suggère que les mécanismes pathologiques mis en jeu dans le développement de la MA modifieraient la vascularisation cérébrale ainsi que l'intégrité de la BHE. Inversement, des dysfonctions vasculaires et une altération de la BHE pourraient promouvoir l'accumulation cérébrale du peptide Aβ. Ainsi, il est aujourd'hui reconnu que des modifications de la

microvascularisation cérébrale font partie intégrante de la pathogénèse de la MA (Bell and Zlokovic, 2009; Müller et al., 2017; Zlokovic, 2011). Plus d'études sont néanmoins nécessaires pour comprendre si ces modifications sont une cause ou une conséquence de la MA.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans la continuité des travaux précédemment réalisés dans notre équipe de recherche, portant notamment sur l'étude de l'intégrité de la BHE dans deux modèles murins de MA, développant soit la pathologie amyloïde (APP/PS1) soit la pathologie Tau et amyloïde (3xTg-AD) mais pas de ND. Les résultats de ces études ont montré que la BHE n'était pas ouverte dans ces deux modèles murins de MA, ce qui est en désaccord partiel avec l'hypothèse neurovasculaire qui suggère qu'une augmentation de la perméabilité de la BHE pourrait être le point de départ de certaines pathologies neurodégénératives telle la MA, en laissant notamment pénétrer dans le SNC des molécules neurotoxiques (Nelson et al., 2016; Zlokovic, 2005, 2011). En revanche, ces travaux ont mis en évidence l'existence d'autres altérations vasculaires, comme la diminution du volume vasculaire cérébral ou encore une modification des échanges de glucose à travers la BHE chez les souris 3xTg-AD mais pas APP/PS1, suggérant l'implication de pTau dans ces modifications (Bourasset et al., 2009; Do et al., 2014). Ces travaux ont également montré l'existence de modifications fonctionnelles de la BHE chez les souris 3xTg-AD, affectant l'expression et la fonction de différents transporteurs d'efflux exprimés au pôle luminal des CECCs (Do et al., 2016). De telles modifications fonctionnelles pourraient avoir un impact important sur la perméabilité cérébrale des candidats médicaments à visée cérébrale.

Ce travail de thèse a donc pour premier objectif d'étudier l'intégrité physique et fonctionnelle de la BHE dans un troisième modèle murin développant la pathologie Tau ainsi qu'une importante ND mais sans pathologie amyloïde. Pour cela, nous avons choisi le modèle p25, présenté dans la partie [I\) C.3.4. Modèles de neurodégénérescence](#). D'autre part, nous avons souhaité savoir si les modifications de la vascularisation cérébrale pouvaient avoir un impact, favorable ou non, sur la perméabilité de la BHE vis-à-vis de molécules dirigées vers le SNC. Le second objectif est donc d'étudier la pharmacocinétique plasmatique et cérébrale ainsi que les caractéristiques de transport au travers de la BHE d'un candidat médicament développé dans l'indication MA (PKRinh, voir paragraphe [I\) B.4.2. La stratégie anti-PKR](#)) chez des souris WT et p25.

MATERIEL ET METHODES

Les différentes lignées de souris transgéniques utilisées dans cette thèse et la technique de perfusion cérébrale *in situ* sont décrites dans cette partie [MATERIEL ET METHODES](#). Les autres méthodes d'étude (étude pharmacocinétique (PK), dosages par HPLC-MS/MS, isolement des microvaisseaux cérébraux, qRT-PCR, immunohistochimie et imagerie confocale) utilisées au cours de la thèse ainsi que l'analyse des résultats sont décrites dans les articles correspondants (voir partie [TRAVAUX PERSONNELS](#)).

I) Animaux

Les études *in vivo* ont été réalisées sur des souris adultes (âgées de 8 à 12 semaines), mâles et femelles. Toutes les souris ont été hébergées dans un environnement maintenu à $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ avec une humidité contrôlée et un cycle alternatif de lumière et d'obscurité de 12h. Les souris avaient un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. Le temps d'acclimatation avant toute expérimentation a été d'au moins 5 jours.

Toutes les expériences animales ont été réalisées dans le respect des règles d'éthique de la réglementation européenne (210/63/EU) relative aux soins et à l'utilisation des animaux de laboratoire. Le protocole de l'étude PK a été conçu conformément aux recommandations du guide ILAR (Institute for Laboratory Animal Research) et à la politique du laboratoire Sanofi sur la protection des animaux ([Article 2](#)). Le protocole de perfusion cérébrale *in situ* a été soumis et accepté par le comité d'éthique de l'Université Paris Descartes (numéro de saisine : 12-181) ([Articles 1, 2 et 3](#)).

A.Souris *Abcb1a*^{-/-}/*Abcb1b*^{-/-}/*Abcg2*^{-/-}

Les souris triple transgéniques, mâles et femelles, KO pour la P-gp et la Bcrp (*Abcb1a*^{-/-}/*Abcb1b*^{-/-}/*Abcg2*^{-/-}) (souris TKO), avec un fond génétique FVB/N, ainsi que leurs contrôles sauvages (FVB/N WT), ont été élevées au sein de l'animalerie de la Faculté de Pharmacie de Paris Descartes, à partir de progéniteurs obtenus du laboratoire du Dr A.H. Schinkel (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Pays-Bas) ([Article 2](#)).

B.Souris p25

Les souris bitransgéniques, mâles et femelles, surexprimant le gène humain codant pour la protéine p25, sous le contrôle du promoteur CaMKII, avec un fond génétique C57BL/6, ainsi que leurs contrôles sauvages (WT), ont été commandées chez Charles River, France ([Articles 1 et 3](#)). Ces souris ont été développées par le Pr L.H. Tsai, et décrites pour la première fois par Cruz et collaborateurs en 2003 (Cruz et al., 2003) (voir description du modèle p25 dans le paragraphe [I\) C.3.4 Modèles de neurodégénérescence](#)).

La nourriture enrichie en doxycycline (A04 diet + doxycycline 1g/kg) permettant d'inhiber l'expression du gène *p25*, a été commandée chez Safe, France.

II) La technique de perfusion cérébrale *in situ*

La technique de perfusion cérébrale *in situ* (PCIS) permet d'étudier, *in vivo*, les mécanismes de transport cérébral d'une molécule d'intérêt au niveau du pôle luminal de la BHE. Cette technique a été développée pour l'étude de la BHE chez le rat en 1984 par Takasato et collaborateurs (Takasato et al., 1984), puis adaptée pour la souris en 2000 par Dagenais et collaborateurs (Dagenais et al., 2000). Dans cette technique, la molécule d'intérêt est introduite directement dans la circulation artérielle (artère carotide), au plus près du cerveau. Les vaisseaux collatéraux sont ligaturés et le cœur est coupé avant de démarrer la perfusion pour s'assurer que la totalité du composé perfusé atteint la circulation cérébrale. Cela présente également l'avantage de s'affranchir de tout métabolisme (le sang est remplacé par le fluide de perfusion) et d'une éventuelle distribution périphérique du composé perfusé. Enfin, le composé est perfusé pendant un temps court (1 min) et à un débit constant, proche du débit de perfusion cérébral de la souris (2,5 ml/min), ce qui permet de s'assurer que la BHE conserve ses propriétés physiologiques pendant toute l'expérience.

La PCIS permet de mesurer, pour un composé donné, les paramètres de transport au travers de la BHE comme le volume de distribution cérébral (V_d , $\mu\text{l/g}$) et la clairance d'entrée cérébrale (K_{in} ou Cl_{up} , $\mu\text{l/g/s}$). Les composés d'intérêt sont radiomarqués au tritium (^3H) ou au carbone 14 (^{14}C) dans cette technique.

La PCIS permet également de révéler l'implication de différents récepteurs/transporteurs dans le passage cérébral d'un composé d'intérêt. Pour cela, on utilise soit des inhibiteurs (non marqués) de ces récepteurs/transporteurs, soit des souris transgéniques déficientes pour l'un ou plusieurs de ces transporteurs, comme par exemple les souris TKO déficientes en P-gp et BCRP.

A. Procédure chirurgicale et technique de perfusion chez la souris

Les souris sont pesées puis anesthésiées par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine et xylazine (respectivement 140 et 8 mg/kg). L'artère carotide commune droite est ligaturée du côté du cœur et l'artère carotide externe droite est ligaturée au niveau de sa bifurcation avec l'artère carotide commune droite. Un cathéter en polyéthylène, relié à une seringue de 1 ml contenant le fluide de perfusion (ou perfusé), est placé dans l'artère carotide commune droite puis fixé à celle-ci par une suture. La seringue est placée sur un pousse-seringue automatique (Harvard pump PHD 2000, Harvard Apparatus), permettant de perfuser l'animal à débit constant et contrôlé. Juste avant le début de la perfusion, la cage thoracique de l'animal est ouverte et le cœur est coupé pour stopper la circulation systémique. A la fin de la perfusion, l'animal est immédiatement décapité et le cortex cérébral est disséqué sur la glace ; le tronc, le cervelet et les bulbes olfactifs sont retirés. L'hémisphère droit (perfusé) de l'animal ainsi que des échantillons du perfusé sont pesés et aliquotés. Les échantillons de tissus cérébral sont dissous dans 2 ml de solubilisant (Solvable®, Perkin Elmer) à 50°C pendant environ 24 h et 9 ml de cocktail à scintillation (Ultima Gold XR®, Perkin Elmer) sont ajoutés à chaque aliquot. La radioactivité de chaque échantillon est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (double comptage $^3\text{H}/^{14}\text{C}$) (Tri-Carb® 2810 TR, Perkin Elmer). Les résultats du comptage vont permettre de calculer les paramètres de transport cérébral du composé d'intérêt, c'est-à-dire son passage au travers de la membrane luminale de la BHE.

B. Fluide de perfusion

Le fluide de perfusion est composé d'un tampon isotonique Krebs-carbonate (128 mM NaCl, 24 mM NaHCO_3 , 4,2 mM KCl, 2,4 mM NaH_2PO_4 , 1,5 mM CaCl_2 , 0,9 mM MgSO_4 et 9 mM D-Glucose), oxygéné par un mélange gazeux O_2/CO_2 (95%/5%) afin de normaliser le pH à 7,4, et maintenu à 37°C. La concentration en D-Glucose du perfusé (9 mM) est proche de la glycémie physiologique de la souris (Dagenais et al., 2000). A ce tampon sont ajoutées les molécules radiomarquées ; le composé d'intérêt, marqué au ^3H ,

pour lequel on étudie le transport à travers la BHE, et un marqueur de l'espace vasculaire (le saccharose dans nos expériences), marqué au ^{14}C . Le saccharose, qui ne traverse pas la BHE en conditions physiologiques et pour un temps de perfusion court (1 min) est ajouté au perfusé pour estimer le volume de l'espace vasculaire cérébral. Ceci permet, d'une part de corriger la concentration cérébrale totale du composé d'intérêt par la contamination vasculaire et, d'autre part de vérifier l'intégrité physique de la BHE de chaque animal.

Enfin, des inhibiteurs (non marqués) de récepteurs/transporteurs exprimés à la BHE, peuvent être ajoutés au fluide de perfusion en fonction de l'objectif de l'expérience. Les inhibiteurs sont préalablement solubilisés dans un véhicule (eau, éthanol ou diméthylsulfoxyde (DMSO)), en veillant à ce que le volume de véhicule n'excède pas 0.5% de celui du perfusé.

C. Calcul des paramètres de transport au travers de la barrière hémato-encéphalique

Les calculs des paramètres de transport d'un composé au travers de la BHE ont été décrits précédemment (Cattelotte et al., 2008; Dagenais et al., 2000; Smith, 1996; Takasato et al., 1984).

Le volume vasculaire cérébral (V_{vasc} , $\mu\text{l/g}$) est estimé grâce au volume de distribution (V_d , $\mu\text{l/g}$) du marqueur de l'espace vasculaire (le ^{14}C -saccharose) :

$$V_{\text{vasc}} = \frac{Q^*}{C_{\text{perf}}^*}$$

avec Q^* (d.p.m./g), la quantité de ^{14}C -saccharose dans l'hémisphère droit et C_{perf}^* (d.p.m./ μl), la concentration de ^{14}C -saccharose dans le perfusé. Un V_{vasc} inférieur à 20 $\mu\text{l/g}$ permet de s'assurer, pour chaque animal, que la BHE est bien restée intacte jusqu'à la fin de l'expérience (Cattelotte et al., 2008).

Le volume de distribution cérébral (V_d , $\mu\text{l/g}$) du composé d'intérêt (appelé substrat) est calculé de la même façon que le V_{vasc} :

$$V_d = \frac{Q}{C_{\text{perf}}}$$

avec Q (d.p.m./g), la quantité de ^3H -substrat dans l'hémisphère droit et C_{perf} (d.p.m./ μl), la concentration de ^3H -substrat dans le perfusé.

Q est obtenu en corrigeant la radioactivité totale mesurée dans l'hémisphère droit par la contamination vasculaire :

$$Q = Q_{\text{tot}} - (V_{\text{vasc}} \times C_{\text{perf}})$$

avec Q_{tot} (d.p.m./g), la quantité totale de [^3H]-substrat mesurée dans l'échantillon cérébral (vasculaire et extravasculaire).

La clairance d'entrée cérébrale (K_{in} ou Cl_{up} , $\mu\text{l/g/s}$) du composé d'intérêt est calculée comme suit :

$$K_{\text{in}} = \frac{V_d}{T}$$

avec T (s), la durée de la perfusion.

Le produit perméabilité-surface (PS, $\mu\text{l/s/g}$) peut ensuite être calculé grâce à l'équation de Renkin-Crone :

$$PS = -F \times \ln \left(1 - \frac{K_{\text{in}}}{F} \right)$$

avec F ($\mu\text{l/s/g}$), le flux de perfusion cérébral, précédemment calculé à l'aide du K_{in} du diazépam, une molécule dont l'extraction cérébrale est presque totale (passage de la BHE flux-dépendant). F se situe entre 42.3 et 52 $\mu\text{l/g/s}$, selon les études (Alata et al., 2015; Cattelotte et al., 2008). Comme détaillé dans l'[Article 2](#), le choix du diazépam comme molécule de référence pour le flux de perfusion cérébral pose certains problèmes, notamment pour les molécules très lipophiles et possédant une fraction libre cérébrale faible, dont le K_{in} peut dépasser celui du diazépam, comme c'est le cas pour PKRinh ([Article 2](#)).

Enfin, le flux cérébral (J_{net} , $\mu\text{mol/g/s}$) du composé d'intérêt peut être calculé comme suit :

$$J_{\text{net}} = PS \times C_{\text{tot}}$$

avec C_{tot} (μM), la concentration totale de substrat (marqué et non marqué) dans le fluide de perfusion.

Dans le cas où le composé d'intérêt est pris en charge à la BHE par un transporteur, J_{net} peut s'écrire sous la forme d'une équation de Michaelis-Menten avec une composante non saturable (la diffusion passive) et une composante saturable (le transport actif ; influx ou efflux) :

$$J_{\text{net}} = K_{\text{passive}} \times C_{\text{tot}} \pm \frac{V_{\text{max}} \times C_{\text{tot}}}{K_m + C_{\text{tot}}}$$

avec $V_{\max}$ ($\mu\text{mol/g/s}$), la vitesse maximale du transport, K_m ($\mu\text{mol}/\mu\text{L}$), la constante de Michaelis-Menten (concentration correspondant à la moitié de la vitesse maximale), K_{passive} ($\mu\text{l/g/s}$), la constante de diffusion passive et C_{tot} en $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$.

TRAVAUX PERSONNELS

1^{ère} partie: Caractérisation de l'intégrité physique et fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique dans un contexte de neurodégénérescence.

Dans cette première partie, nous avons exploré l'intégrité physique et fonctionnelle de la BHE dans un modèle murin présentant une ND rapide et sévère associée à une hyperphosphorylation de la protéine Tau (modèle p25). Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux modulations de la densité vasculaire cérébrale, de la perméabilité de la BHE, du volume vasculaire cérébral et de la surface d'échange sang/cerveau de ces souris, par rapport à des souris saines, à deux périodes (3 et 6 semaines) de ND induite par l'expression de p25. Nous avons ensuite exploré la fonctionnalité du transport facilité à la BHE de ces souris, et en particulier des transporteurs impliqués dans l'influx cérébral des nutriments dans le cerveau, essentiels au bon fonctionnement du SNC.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article ([Article 1](#)), actuellement en préparation pour soumission dans le journal « Neuropharmacology ».

2^{ème} partie: Etude de l'impact des modifications fonctionnelles de la barrière hémato-encéphalique sur le passage d'un candidat médicament à visée cérébrale dans un contexte de neurodégénérescence

Dans cette deuxième partie, nous avons poursuivi l'exploration des modifications fonctionnelles de la BHE chez les souris p25, notamment en termes d'expression et de fonction de transporteurs d'influx et d'efflux, et avons étudié les conséquences de telles modifications sur le passage de la BHE d'un candidat médicament visant à traiter les MND.

Pour cela, nous avons commencé par caractériser la distribution cérébrale et les mécanismes impliqués dans le passage de la BHE de PKRinh, un inhibiteur sélectif de l'activation de PKR, chez des souris saines. Ces travaux font l'objet d'un article ([Article 2](#)) publié dans le journal « European Journal of Pharmaceutical sciences ».

Dans un deuxième temps, nous avons étudié, chez les souris p25, l'expression et la fonction de différents récepteurs et transporteurs exprimés à la BHE, notamment ceux impliqués dans le transport de PKRinh ou encore d'A β et du cholestérol, deux substances jouant un rôle important dans la pathogénèse de la MA. Ces travaux font l'objet d'un article ([Article 3](#)), actuellement en préparation pour soumission dans le journal « Journal of Alzheimer's Disease ».

**1^{ère} partie: Caractérisation de l'intégrité
physique et fonctionnelle de la barrière
hémato-encéphalique dans un contexte
de neurodégénérescence**

Article 1

Article 1: Modifications of physical and functional integrity of the blood-brain barrier in an inducible mouse model of neurodegeneration.

C. Taccola, P. Barneoud, S. Cartot-Cotton, D. Valente, N. Schussler, B. Saubaméa, S. Chasseigneaux, V. Cochois, V. Mignon, E. Curis, M. Lochus, S. Nicolic, A. Dodacki, S. Cisternino, X. Declèves, F. Bourasset

Article en préparation pour soumission dans le journal « Neuropharmacology ».

Introduction

De nombreux travaux suggèrent que des anomalies neurovasculaires pourraient jouer un rôle clé dans la pathogénèse de nombreuses MND, et en particulier dans la MA. Ces modifications pourraient être responsables, au moins en partie, de l'accumulation cérébrale d'A β et de la survenue de dysfonctions neuronales et synaptiques conduisant à la ND dans la MA. De plus, un hypométabolisme cérébral a été mis en évidence chez les patients atteints de la MA, qui pourrait être attribué à une diminution de son transport cérébral au travers de la BHE. Des modifications de l'intégrité physique ainsi qu'une altération du passage cérébral du glucose ont également été observées dans différents modèles murins de la MA, reproduisant la pathologie amyloïde seulement, ou bien associée à la pathologie Tau, mais aucune étude n'a exploré les modulations de la BHE dans un modèle de ND présentant une atrophie cérébrale et une pathologie Tau, en l'absence de pathologie amyloïde.

Objectif

L'objectif de cet article est de déterminer s'il existe des modifications de l'intégrité physique et fonctionnelle de la BHE, avec un intérêt particulier pour la diffusion facilitée des nutriments, dans un modèle murin de ND, le modèle p25, à deux stades de la maladie.

Méthodes

L'expression des gènes codant pour des protéines des JS, les transporteurs de nutriments (Glut1 et Lat1), et la GFP a été mesurée par qRT-PCR sur des microvaisseaux cérébraux isolés de souris WT et p25 après 3 ou 6 semaines d'induction. L'expression de la GFP, de Glut1 et du collagène IV a été mesurée par

imagerie confocale sur coupes coronales fines de cerveaux. Les clairances d'entrée cérébrale de différents substrats comme des marqueurs du volume vasculaire cérébral et de la surface d'échange sang/cerveau, ou encore de nutriments (glucose et phénylalanine) ont été mesurées par la technique de perfusion cérébrale *in situ*.

Principaux résultats

Nous avons montré que l'induction de l'expression de *p25* s'accompagnait d'une atrophie cérébrale sévère (-29% du poids du cerveau après 6 semaines d'induction) chez les souris p25, mais sans atrophie du réseau vasculaire cérébral. Nous avons également montré que l'intégrité physique de la BHE ainsi que la surface d'échange sang/cerveau sont préservées chez les souris p25. En revanche, ces souris présentent une réduction du volume vasculaire cérébral, qui s'accompagne d'une part d'une augmentation de l'expression génique de *Tjp1*, codant pour l'une des protéines des JS présentes au niveau de la BHE, et d'autre part d'une augmentation du dépôt de collagène IV dans la paroi de leurs microvaisseaux cérébraux à 6 semaines d'induction, suggérant un épaississement de leur lame basale. Enfin, l'influx cérébral de glucose, mais pas de la phénylalanine, est significativement diminué chez les souris p25 à 6 semaines d'induction, sans modification de l'expression du gène (*Glut1*) ni de la protéine (*Glut1*) de son transporteur à la BHE.

Conclusion

En dépit d'une ND sévère, les souris p25 ne présentent pas d'altération de l'intégrité physique de la BHE, en accord avec les résultats obtenus dans des modèles murins de la MA. En revanche, ces souris présentent une diminution du transport cérébral du glucose ainsi que des modifications morphologiques, notamment une diminution de leur volume vasculaire cérébral, associé à un épaississement de la lame basale de leurs microvaisseaux cérébraux. Des modifications similaires ont été observées chez les patients atteints de la MA mais aussi dans d'autres modèles murins présentant à la fois une pathologie amyloïde et Tau, mais pas dans des modèles murins ne présentant que la pathologie amyloïde, ce qui suggère un rôle de pTau dans les modifications morphologiques de la BHE au cours de la ND et notamment dans la MA.

Title: Modifications of physical and functional integrity of the blood-brain barrier in an inducible mouse model of neurodegeneration

Corresponding author: Fanchon Bourasset

Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

+331 53 73 98 59

fanchon.bourasset@parisdescartes.fr

Authors: Camille Taccola^{1,4,5,6}, Pascal Barneoud², Sylvaine Cartot-Cotton¹, Delphine Valente³, Nathalie Schussler², Bruno Saubaméa^{4,5,6}, Stéphanie Chasseigneaux^{4,5,6}, Véronique Cochois^{4,5,6}, Virginie Mignon^{4,5,6}, Emmanuel Curis^{4,5,7,8}, Murielle Lochus^{4,5,6}, Sophie Nicolic^{4,5,6}, Agnès Dodacki^{4,5,6}, Salvatore Cisternino^{4,5,6}, Xavier Declèves^{4,5,6}, Fanchon Bourasset^{4,5,6}.

¹ Pharmacokinetics, Dynamics and Metabolism, Translational Medicine & Early Development, Sanofi, France.

² Neuroscience Therapeutic Area, Sanofi, France.

³ Drug Metabolism & Pharmacokinetics, Research platform, Sanofi, France.

⁴ Variabilité de Réponse aux Psychotropes, Inserm, U1144, Paris, F-75006, France.

⁵ Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, UMR-S 1144, Paris, F-75006, France.

⁶ Université Paris Diderot, UMR-S 1144, Paris, F-75013, France.

⁷ Laboratoire de biomathématiques, plateau iB²

⁸ Service de bioinformatique et statistique médicale, hôpital Saint-Louis, APHP

Keywords: Alzheimer's disease; Neurodegeneration; p25 mice; Blood-brain barrier; *In situ* brain perfusion; Vascular density

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease ; BBB, blood-brain barrier ; BCECs, brain capillary endothelial cells; Cl_{up} , brain uptake clearance ; V_{vasc} , brain vascular volume ; ND, neurodegeneration; CNS, central nervous system; A β , amyloid beta peptide; NFTs, neurofibrillary tangles; SLC, solute carriers; ABC, ATP-binding cassette transporters; APP, amyloid precursor protein; Cdk5, cyclin-dependent kinase 5.

Highlights:

- The BBB physical integrity and brain vascular surface are not altered in p25 mice after up to 6 weeks of *p25* induction, despite extensive neurodegeneration
- The cerebrovascular volume is decreased and the basement membrane thickness is increased in p25 mice after 6 weeks of *p25* induction
- D-glucose uptake is reduced in p25 mice after 6 weeks of *p25* induction without any modification of transporter's protein or gene expression
- Despite the BBB up-regulation of LAT1, the phenylalanine brain uptake is not increased in p25 mice

Abstract:

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the progressive loss of central nervous system neurons associated with two histological hallmarks: accumulation of amyloid beta peptide (A β) and intraneuronal deposition of hyperphosphorylated Tau protein (pTau). Cerebrovascular abnormalities also appear early in the pathogenesis of AD. We chose the p25 mouse model to evaluate the physical and functional integrity of the blood-brain barrier (BBB) in a context of Tau pathology (pTau) and severe neurodegeneration (ND), in an early (3 weeks of p25 induction) and later (6 weeks of p25 induction) stage of the pathology. Using *in situ* brain perfusion and confocal imaging, we showed that despite the severe ND, the brain vascular surface and the BBB physical integrity were unaltered in p25 mice, whatever the stage of the pathology. However, our results evidenced a 15% decrease in the cerebrovascular volume after 6 weeks of p25 induction, possibly explained by a 27% increase of collagen IV in the basement membrane of mice brain capillaries. Functional BBB influx/uptake with D-glucose was shown reduced by about 19% whereas the Lat1 substrate phenylalanine was unaltered after 6 weeks of p25 induction. No modification of the transporter's protein (Glut1, Slc2a1) expression was shown in brain capillaries. Lack of BBB integrity loss and reduction of the BBB function for D-glucose influx have been consistently observed in mouse models of AD. In contrast, a decrease of the cerebrovascular volume and an increase in the basement membrane thickness seem more specifically attributed to the pTau in AD.

1. Introduction

Neurodegenerative disorders, the most common neurological diseases, are mainly characterized by the injury and progressive loss of central nervous system (CNS) neurons. Although the clinical features of the different diseases are diverse, they share some similarities on the sub-cellular level. The exact molecular mechanisms underlying neurodegeneration (ND) are still being investigated but it has been shown that brain inflammation (Block and Hong, 2005; Gu et al., 2010; Heneka et al., 2015; Kreutzberg, 1996), calcium homeostasis alteration (Mattson et al., 2000; Popugueva et al., 2017), mitochondrial dysfunction and oxidative stress (Kim et al., 2015; Gandhi and Abramov, 2012; Wang and Michaelis, 2010; Lin and Beal, 2006) are phenomenon that are shared by all neurodegenerative diseases. Alzheimer's disease (AD), the most frequent of these diseases, is associated with progressive cognitive decline, memory loss and behavioral changes. Its prevalence is constantly increasing in developed countries due to their aging population, age being one of the main risk factor for the sporadic form of AD. From a pathophysiological point of view, AD is characterized by two histological hallmarks which are the extracellular deposit of amyloid beta ($A\beta$) peptide, also known as the senile plaques, and the intracellular accumulation of hyperphosphorylated Tau (pTau) proteins, also known as the neurofibrillary tangles (NFTs) (Katzman, 1986; Duyckaerts et al., 2009; Crews and Masliah, 2010). Although research on AD has been intensive since the first description of the disease in 1906 (Alzheimer, 1906), there is still a lack of pharmacological treatment available to efficiently slow down or stop the course of the disease. Furthermore, besides the need for pharmacological efficacy, drugs aiming to treat CNS disorders must also cross the blood-brain barrier (BBB), the main exchange interface between the circulating blood and the brain parenchyma. The BBB is made of a monolayer of brain capillary endothelial cells (BCECs), joined together by tight junctions which restrict paracellular diffusion (Brightman and Reese, 1969). The BBB also expresses solute carriers (SLC) and ATP-binding cassette (ABC) transporters to regulate the influx and efflux of essential substrates, such as D-glucose or amino acids but also inorganic ions or xenobiotics. Indeed, the main role

of the BBB is to maintain the cerebral homeostasis and prevent circulating toxins to reach the brain parenchyma (Abbott, 2013). In some CNS pathologies including the neurodegenerative diseases, the BBB can be altered, in terms of integrity, function, or both (Vliet et al., 2007; Zlokovic, 2008). In AD, studies of the physical integrity of the BBB have led to controversial results, depending on the stage of the pathology and the methods used to evaluate this integrity. Hence, some results showed a BBB breakdown (Farrall and Wardlaw, 2009; Halliday et al., 2016; van de Haar et al., 2016; Zipser et al., 2007) whereas others showed unaltered BBB integrity (Alafuzoff et al., 1987; Bronge and Wahlund, 2000; Frölich et al., 1991). Besides the eventual modification of the BBB tightness, it was shown that AD patients display a significantly lower cerebral blood flow (Farkas and Luiten, 2001; Iadecola, 2004), reduced microvessels density and increased irregularity of capillary surfaces (Bailey et al., 2004; Farkas and Luiten, 2001; Zlokovic, 2008). Moreover, the cerebral glucose metabolism and the glucose transporter 1 (GLUT1/SLC2A1) expression are decreased in AD patients (Campos-Bedolla et al., 2014; Chen and Zhong, 2013; Hooijmans et al., 2007; Kalaria and Harik, 1989; Mooradian et al., 1997). Interestingly, it was shown that the extent of the brain glucose hypometabolism was correlated with symptoms severity (Desgranges et al., 1998; Grady et al., 1986; Haxby et al., 1990). Finally, other receptors and transporters expressed at the BBB being especially involved in the control of the cerebral A β level have been shown to be modulated in AD and thereby in the pathogenesis of AD: the low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) (Donahue et al., 2006; Jaynes and Provias, 2008), the P-glycoprotein (ABCB1, P-gp) (Assema et al., 2012; Donahue et al., 2006), the breast cancer resistance protein (ABCG2, BCRP) (Xiong et al., 2009) and the receptor for advanced glycation end products (RAGE) (Donahue et al., 2006; Jaynes and Provias, 2008). However, more studies are needed to understand how modifications of the BBB permeability and function can explain the pathophysiological events that trigger ND in AD. Nevertheless, it was hypothesized that AD and cerebrovascular abnormalities are closely

linked, and that vascular damages might be the first step to ND in AD (Montagne et al., 2015; Zlokovic, 2005, 2011).

Because it is very difficult to explore the BBB in humans, mouse models of AD have been developed and used to investigate the BBB permeability, the brain vascular volume, and the expression of receptors and transporters at the BBB. Hence, the BBB integrity and function have been studied in transgenic mouse models of AD that display either cerebral accumulation of A β only (Do et al., 2014; Hooijmans et al., 2007; Minogue et al., 2014), or both A β and pTau (Bourasset et al., 2009; Do et al., 2014, 2016), or in a model carrying the main genetic risk factor for sporadic AD, e.g. *APOE ϵ 4* (Alata et al., 2015). However, no study has yet assessed the BBB in a mouse model that would display both Tau pathology and ND, without A β pathology. We chose the p25 mouse model to explore the physical and functional integrity of the BBB in a context of increased pTau, severe neuronal loss and brain atrophy.

Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is a ubiquitously expressed, proline-directed protein kinase known to contribute to the regulation of brain cortex development, learning and memory processes. Under physiologic conditions, Cdk5 is activated by interacting with one of its postmitotic neuron-specific activator proteins, p35 or p39, which restricts Cdk5 activity to the CNS (Lew et al., 1994; Tang et al., 1995; Tsai et al., 1994). The complex Cdk5/p35 plays a critical role in normal cortical development but also in neuronal migration and differentiation, synaptogenesis and synaptic plasticity (Cheung et al., 2006; Cheung and Ip, 2004; Ko et al., 2001). Under neurotoxic conditions, such as oxidative stress, excitotoxicity or A β accumulation, p35 can be converted to the truncated p25 protein by a calcium-dependent protease calpain. It has been shown that p25 confers an enhanced stability and activity to Cdk5, and redirects the kinase towards its pathologic substrates such as Tau and neurofilaments (Cruz et al., 2003, 2006; Noble et al., 2003; Patrick and Zukerberg, 1999). This aberrant p25-dependent hyperactivation of Cdk5 has been linked to neurotoxicity in several neurodegenerative disorders such as AD (Patrick and Zukerberg, 1999; Tseng et al., 2002). Indeed, elevated levels of p25 as well as increased

Cdk5 activity have been measured in postmortem AD brain samples (Lee et al., 1999; Patrick and Zukerberg, 1999; Swatton et al., 2004; Tseng et al., 2002). Cruz et al., have developed a bitransgenic mouse model of ND that inducibly overexpresses the human p25 protein in the forebrain, under the control of the CamKII promoter (CamKII-TetOp25 mouse model, or “p25”) (Cruz et al., 2003). Shortly after *p25* induction, mice display some key pathological hallmarks of AD such as neuronal loss, brain atrophy, but also increased pTau after 5 weeks, impaired synaptic plasticity and severe cognitive impairment after 6 weeks and extensive astrogliosis after 8 weeks of *p25* induction (Cruz et al., 2003, 2006; Fischer et al., 2005; Shukla et al., 2017). Unlike other existing AD models and other promoters-induced p25 expression neurodegenerative models, the p25 model exhibits rapid ND with extensive neuronal loss, hyperphosphorylation of endogenous Tau (as opposed to mutated Tau models) (Cruz et al., 2003; Iba et al., 2013), postnatal expression of p25 (limiting potential developmental compensation in constitutive p25 overexpression models (Bian et al., 2002; Takashima et al., 2001)) and reversibility of the pathology by repression of p25 expression or inhibition of the Cdk5/p25 complex activity (Fischer et al., 2005; Shukla et al., 2017). However, to date, little is known about the BBB integrity of these mice. We used the *in situ* brain perfusion method and confocal imaging to investigate the implications of Cdk5 aberrant activation on the physical and functional integrity of the BBB in these mice on early (3 weeks) and advanced (6 weeks) stages of p25-induced ND.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and chemicals

[¹⁴C]-sucrose (435.0 mCi/mmol), [³H]-deoxy-D-glucose (8.0 Ci/mmol) and [³H]-phenylalanine (128.1 Ci/mmol) were purchased from PerkinElmer, USA. [³H]-diazepam (80.0 Ci/mmol) was purchased from Hartmann Analytic, Germany. Ultima Gold XR® liquid scintillation cocktail and Solvable® tissue solubilizer

were purchased from PerkinElmer, The Netherlands. RNA isolation kits (RNeasy Micro kit) were purchased from Qiagen, Germany. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) reagents were purchased from Invitrogen, France. Power SYBR® Green PCR Master Mix was purchased from ThermoFisher Scientific, USA. All other chemicals were reagent grade commercial products.

2.2. Animals

In this study, we used an inducible mouse model of human p25 overexpression in the postnatal forebrain, the CamKII-tTA-TetO-p25-eGFP mice, also known as p25 mice. These mice were created by Prof. Tsai and colleagues and were described for the first time in 2003 (Cruz et al., 2003). Briefly, they used the tetracycline-controlled transactivator (tTA) system to generate bitransgenic mice that inducibly over-express human *p25* under the control of the CamKII promoter, which drives specific transgene expression in the neurons of the forebrain (neocortex, hippocampus, amygdala and basal ganglia) (Mayford et al., 1996). Human *p25* was previously C-terminally tagged with enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) in order to allow transgene expression detection. In the presence of the tetracycline derivative doxycycline, expression of the *p25* transgene is inhibited. The transgene expression is turned ON when mice are switched to a doxycycline-free diet. All mice were thus conceived and raised for about 6 weeks in the presence of doxycycline (A04 diet + doxycycline 1 g/kg (Cruz et al., 2003), Safe, France) before induction. Our studies were carried out after 3 or 6 weeks of *p25* induction. Induction periods will be referred, respectively, as “3 Weeks ON” and “6 Weeks ON” in this article. Males and females mice were used in an equivalent ratio in all experiments. The bitransgenic inducible mice will be referred as “p25 mice” in this article. Non-transgenic, same sex (whenever possible) littermate mice were used as controls and will be referred as “WT mice” in this article. All mice were produced and provided by Charles River, France. They were housed in a pathogen-free environment maintained at 22 ± 2 °C with controlled humidity, a 12-hour light/12-hour dark cycle and access to food and tap water *ad libitum*. The acclimatization time before induction was at least 5 days. All experiments complied with the ethical rules

of the European directive (2010/63/EU) for experimentation with laboratory animals and were approved by the ethics review committee of Paris Descartes university (study approval n° 12-182).

2.3. *In situ* brain perfusion

The *in situ* brain perfusion method is commonly used to study drug transport processes occurring at the luminal side of the BBB (Takasato et al., 1984; Dagenais et al., 2000; Cattelotte et al., 2008). This technique allows the measurement of different useful parameters of the p25 mice BBB after 3 and 6 weeks of p25 induction, such as distribution volumes and brain uptake coefficients. We first assessed the brain distribution volume of [¹⁴C]-sucrose, which is known for not crossing the BBB in physiological conditions and over a short perfusion time. The distribution volume of [¹⁴C]-sucrose is thus a good indicator of the physical BBB integrity (Dagenais et al., 2000). We assessed the passive diffusion through the BBB by using [³H]-diazepam, a highly lipophilic drug that readily crosses the BBB in a flow-limited manner. Since the perfusion fluid is forced and constant during the experiment, the [³H]-diazepam brain uptake is a good indicator of the surface of the BBB (Alata et al., 2015; Bourasset et al., 2009). We also assessed the function of two BBB transporters, Glut1 (Slc2a1) and Lat1 (Slc7a5), by measuring the brain uptake of their substrates, [³H]-deoxy-D-glucose (Dick et al., 1984; Guo et al., 2005), metabolically more stable than the D-glucose, and [³H]-phenylalanine (Kanai et al., 1998; Smith et al., 1987), respectively.

Surgical procedure and perfusion technique: WT and p25 mice were weighted and anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine-xylazine mixture (140 and 8 mg/kg respectively). The right common carotid artery was ligated on the heart side and the right external carotid artery was ligated at the level of its bifurcation from the common artery. The right common carotid was then catheterized with heparin-filled polyethylene tubing (0.3 mm i.d. x 0.7 mm o.d.). The syringe containing the perfusion fluid was placed in an infusion pump (Harvard pump PHD 2000, Harvard Apparatus, France) and connected to the catheter. Just before perfusion, the thorax of the animal was opened and the heart was

cut to ensure that the entire brain blood is replaced by the perfusion fluid. Perfusion was started immediately at a flow rate of 2.5 ml/min. Each mouse was perfused with the appropriate [³H]-substrate (0.3 µCi/ml) and [¹⁴C]-sucrose (0.1 µCi/ml) for 1 minute. The perfusion was terminated by decapitating the animal. The brain was removed from the skull and dissected on ice to isolate the right brain hemisphere. Brain samples as well as aliquots of the perfusion fluid were placed in tared glass vials and weighted. Brain samples were digested in 2 ml of Solvable® for about 24h. Brain and perfusion fluid samples were mixed with 9 ml of Ultima Gold XR® scintillation cocktail. For all samples, ³H and ¹⁴C isotopes were counted simultaneously in a liquid scintillation counter (Tri-Carb® 2810 TR, PerkinElmer).

Perfusion fluid: The perfusion fluid consisted of Krebs bicarbonate-buffered physiological saline (in mM: 128 NaCl, 24 NaHCO₃, 4.2 KCl, 2.4 NaH₂PO₄, 1.5 CaCl₂, 0.9 MgSO₄ and 9 D-glucose) warmed at 37 °C and gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ to obtain a pH of 7.4. The D-glucose concentration of the perfusion fluid (9 mM) is close to the physiologic mouse glycemia. [¹⁴C]-sucrose and [³H]-substrates (diazepam, deoxy-D-glucose or phenylalanine), diluted in DMSO, were added to the perfusate depending on the experiment. DMSO did not exceed 0.5% of the perfusate's volume.

Calculation of the BBB transport parameters: Calculations were done as previously described (Cattelotte et al., 2008; Dagenais et al., 2000; Smith, 1996; Takasato et al., 1984). The brain vascular volume (V_{vasc}, µl/g) was estimated from the volume of tissue distribution of [¹⁴C]-sucrose, which is known for not crossing the BBB during short perfusion time. V_{vasc} was calculated as follows:

$$V_{\text{vasc}} = \frac{Q_{\text{sucrose}}}{C_{\text{sucrose}}} \quad (\text{Eq 1})$$

where Q_{sucrose} (dpm/g) is the amount of [¹⁴C]-sucrose in the right brain hemisphere and C_{sucrose} (dpm/µl) is the [¹⁴C]-sucrose concentration in the perfusion fluid. The apparent brain tissue distribution volume (V_d, µl/g) of [³H]-substrates was calculated as follows:

$$V_d = \frac{Q}{C_{\text{perf}}} \quad (\text{Eq 2})$$

where Q (dpm/g) is the amount of [³H]-substrate in the right brain hemisphere and C_{perf} (dpm/μl) is the [³H]-substrate concentration in the perfusion fluid. In order to account for vascular contamination of the brain hemisphere, Q was previously corrected by subtracting the [³H]-substrate remaining in the vascular space (V_{vasc} × C_{perf}) from the total [³H]-substrate in the tissue sample (Q_{tot}, dpm/g):

$$Q = Q_{\text{tot}} - (V_{\text{vasc}} \times C_{\text{perf}}) \quad (\text{Eq 3})$$

The brain uptake parameter or “brain clearance” (K_{in} or Cl_{up}, μl/g/s), was calculated as follows:

$$Cl_{\text{up}} = \frac{V_d}{T} \quad (\text{Eq 4})$$

where T is the perfusion time in seconds.

2.4. Cortical microvessels isolation, mRNA extraction and Reverse Transcription (RT)

Cortical microvessels were obtained by mechanical homogenization from WT and p25 mice brains as previously described (Dauchy et al., 2008; Yousif et al., 2007). Brains were dissected to remove olfactory bulbs, cerebellum, thalamus, white matter and meninges. For each sample, brain from 4 to 6 mice were pooled, minced in 30 ml of ice-cold buffer 1 (Hanks’ balanced salt solution (HBSS) 1X + HEPES 10 mM (ThermoFisher Scientific)) and homogenized by 10 up-and-down strokes at 400 rpm using a Potter-Thomas homogenizer (Kontes Glass Inc, USA). The resulting homogenate was centrifuged at 600 g for 5 min at 4 °C. The microvessel-enriched pellet was suspended in 20 ml of buffer 2 (buffer 1 + 17.5% dextran (Sigma-Aldrich, USA)) and centrifuged at 4500 g for 15 min at 4 °C to remove residual myelin. The resulting pellet was suspended in 35 ml of buffer 3 (buffer 1 + 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)), passed successively through a 100 μm (Falcon) and a 10 μm (Merck Milipore) mesh nylon filter. The cortical microvessels, retained on the 10 μm filter surface, were collected by agitation of the filter in 40 ml of buffer 3 and centrifuged at 1200 g for 10 min at 4 °C. The pellet was suspended in 5 ml of buffer 1 and centrifuged one more time at 1200 g for 10 min at 4 °C. The pellet was suspended in RLT buffer (Qiagen) containing 1% β-mercaptoethanol and sonicated for 4 min at a frequency of 30

strokes per second. The lysate was centrifuged at 16000 g for 10 min at 4 °C and the supernatant was saved for RNA extraction. Total RNA were extracted from each microvessels sample using RNeasy micro kits from Qiagen, according to the manufacturer's instructions. Briefly, samples were diluted 1/2 with 70% ethanol and placed in spin columns. Columns were washed with the appropriate buffer according to protocol and incubated 15 min at room temperature with DNase I (Qiagen) to avoid genomic DNA contamination of the samples. Columns were washed again with appropriate buffer and 80% ethanol and total RNA was finally eluted from columns with 14 µl of DNase free water. The RNA concentration was determined for each sample at 260 nm using a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). The RNA concentrations ranged from 25 to 120 ng/µl depending on the size of the sample. For each sample, 300 ng of extracted RNA were converted to cDNA using a SuperScript® II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) as previously described (Marie-Claire et al., 2004). Briefly, the reverse transcription (RT) was performed in a final reaction mixture of 50 µl containing 500 µM of each dNTP, 10 mM of DTT, 1.5 µM of random hexanucleotides primers, 50 U of ribonuclease inhibitor and 250 U of SuperScript® II reverse transcriptase. Samples were incubated 10 min at 25 °C, then 30 min at 42 °C and 5 min at 99 °C in a thermal cycler (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad). cDNAs were kept at -80 °C until PCR analysis.

2.5. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

The expression of genes encoding tight junctions proteins (ZO-1, Claudin-5 and Occludin), SLC transporters (glucose transporter 1 (Glut1) and L-type amino acid transporter 1 (Lat1)) and eGFP was measured by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) on a ABI Prism 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems, USA) using SYBR® Green fluorescence detection. All primers used for qRT-PCR (see Table 1) were designed by Oligo 7.60 software (Molecular Biology Insights, USA), ordered from Eurogentech, Belgium and tested upstream on positive controls (untreated C57BL/6 mice cortex). Thermal cycling was carried out in a final volume of 20 µl containing 10 µl of SYBR® Green, 1 µl of the forward primer (10

μM), 1 μl of the reverse primer (10 μM) and 8 μl of each sample diluted cDNA (1:20 in DNase free water). The thermal cycling conditions were 10 min at 95 °C, followed by 40 amplification cycles at 95 °C for 15 sec and 60 °C for 45 sec. Fluorescent output, measured as cycling time (Ct), is proportional to the log of cDNA concentration. The detection threshold was set to Ct = 30. The β-actin gene was used as an endogenous reference for normalizing target cDNAs. Data were analyzed using the comparative Ct method ($\Delta\Delta Ct$) to calculate relative gene expression. ΔCt is the Ct difference between the gene of interest and the β-actin gene. For each gene of interest, $\Delta\Delta Ct$ was calculated by subtracting the ΔCt of one sample from the average ΔCt obtained in control animals (WT). The $\Delta\Delta Ct$ value of each gene was transformed to an absolute value reflecting the expression profile of each gene in each sample by the following formula: gene expression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.6. Immunostaining and confocal microscopy

WT and p25 mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine-xylazine mixture (140 and 8 mg/kg respectively) and perfused transcardially with NaCl 0.9% for 1 min followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) for 12 min. Brains were carefully collected, immersed in the same fixative for 2 h at 4 °C, rinsed and stored overnight in PBS at 4 °C. Coronal brain sections (50 μm) in the region of the hippocampus (-2 mm from Bregma) were prepared using a vibratome (Leica VT 1000E, Leica microsystems GmbH, Germany), cryopreserved in PBS + 20% sucrose (3 changes in 24 h) and frozen at -80 °C until immunohistofluorescence assay. Immunostaining was performed on free-floating sections under gentle rocking and at room temperature unless otherwise specified. Thorough PBS washing was performed after each incubation step. Frozen sections were thawed and rinsed 6 times in PBS to remove the remaining sucrose. All sections were then permeabilized in PBS + 0.5% Triton X-100 (ThermoFisher Scientific) for 30 min. Sections were blocked for free aldehydes in PBS + 100 mM glycine for 20 min and incubated in PBS + 0.1% Triton X-100 (PBST) containing 10% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch, USA) and 1% BSA for 2 h. Staining was performed by

incubation in primary antibodies (See **Table 2**) diluted in PBST for 24 h, followed by incubation in secondary antibodies (See **Table 2**) diluted 1/500 in PBST overnight. For each assay, nonspecific staining was controlled by omitting the primary antibody. Cell nuclei were counterstained with TOPRO-3 (ThermoFisher Scientific) diluted 1/500 for 20 min and sections were mounted in glycerol/PBS (9:1/v:v) using 0.17 mm thick glass coverslips (Assistent, Germany). Images were recorded on a Leica SP8 confocal microscope (Leica microsystems GmbH) equipped with a 40X objective (numerical aperture = 1.30). For each labelling, all images were taken at a constant depth within the tissue (10 μ m below the surface of the section) with constant acquisition parameters across all regions and animal. No detectable signal was observed when primary antibodies were omitted. Total pixel area and mean pixel intensity were quantified in Fiji (www.imagej.net, n.d.) after image thresholding using the same threshold value for all images.

2.7. Statistical analysis

Data are shown as mean $\pm$ standard deviation (SD). When applicable, a Student's two-tailed unpaired t-test or a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-test was used to identify significant differences. Analyses were performed on GraphPad Prism software and statistical significance was set at $p < 0.05$.

Immunofluorescence data were analyzed using a linear mixed model on log-transformed values, using the mouse as a random effect, the side (right or left) and the genotype (WT or p25) as crossed fixed effects, with interaction. The model was fitted to maximize the likelihood, using the lme4 package. Despite the Gaussian distribution hypothesis appeared fulfilled, 95 % confidence intervals on the parameters were obtained using bootstrap (1000 drawings). The parameter was considered significant if this interval did not contain the 1 value after back-transforming to the original scale. Analyses were performed using R software.

3. Results

3.1. Efficacy of induced *p25* expression and progressive brain atrophy in p25 mice

We first confirmed that the *p25-eGFP* transgene was efficiently expressed in p25 mice after both induction periods (3 and 6 weeks ON). We showed by qRT-PCR that eGFP mRNA was expressed in isolated brain microvessels of p25 mice after 3 and 6 weeks ON (mean Ct= 22.0 ± 0.62 and 23.0 ± 0.60 , respectively, N = 3 pools of 4 to 6 mouse brains each), but not in WT mice (Ct > 30.0 for all samples). We confirmed by immunohistofluorescence microscopy that the eGFP protein was expressed on coronal brain sections (50 μ m) of p25 mice after 6 weeks ON, but not in WT mice (**Fig. 1. A**).

We showed that induction of transgene expression was accompanied by a significant brain atrophy, which was evaluated by measuring the right brain hemisphere weight of WT and p25 mice, sampled after *in situ* brain perfusion experiments. P25 mice presented a significantly smaller right brain hemisphere weight, compared to WT mice (0.113 ± 0.010 g in p25 mice vs. 0.135 ± 0.013 g in WT mice (-16.1%), $p < 0.001$, after 3 weeks ON and 0.098 ± 0.013 g in p25 mice vs. 0.137 ± 0.010 g in WT mice (-28.6%), $p < 0.001$, after 6 weeks ON) (**Fig. 1. B**). It is noteworthy that the cerebral atrophy was clearly visible on the coronal brain sections by immunohistofluorescence microscopy (see **Fig. 1. A**).

3.2. Integrity of the cerebrovascular tree in p25 mice

Brain microvessels density and blood-brain barrier exchange surface

We evaluated whether the progressive brain atrophy observed in p25 mice was accompanied by a global alteration of the cerebrovascular tree. In the brain, GLUT1 is highly and exclusively expressed in BCECs (Farrell and Pardridge, 1991; Shawahna et al., 2011). GLUT1 immunostaining has thus been used to quantify the brain vessels density (Craggs et al., 2013; Fuest et al., 2009). Therefore, using confocal microscopy on Glut1 immunolabelled brain sections, we measured the Glut1+ area in a constant field of view within the cortex as a surrogate of the cortical vascular density. The brain vessels density was

significantly increased in p25 mice, compared to WT mice, after 6 weeks ON (Glut1+ area= 3464 μm^2 in p25 mice vs. 2771 μm^2 in WT mice (+20%), IC à 95 %: [4.6 ; 47.92]) (**Fig. 2. A**). This apparent increase in vessels density can either be attributed to a 20% growth of the vasculature, which seems unlikely in ND, or to a 20% reduction in the total area of the coronal brain section, without any modification of the brain vessels quantity. Assuming that the coronal brain section is a disk and the brain is a sphere, a reduction of 20% of the disk area corresponds to a reduction of about 10% of the radius (r) of the disk, since the disk area is given by πr^2 and of 28.4% of the sphere volume, given by $4/3 \pi r^3$, which is in good accordance with the 28.6% decrease in the brain weight obtained in p25 mice after 6 weeks ON (**Fig. 1. B**). Thus, our results suggest that the increased vascular density observed in the brain of p25 mice after 6 weeks ON, does not reflect a growth of the vasculature but rather an atrophy of the brain parenchyma. In other words, the progressive brain atrophy observed in p25 mice does not seem to affect the cerebral microvessels, suggesting a conserved brain microvessel's exchange surface in p25 mice compared to WT. We thus evaluated the brain microvessel's exchange surface by measuring, using the *in situ* brain perfusion technique, the brain uptake clearance (Cl_{up}) of [^3H]-diazepam, which can be used as an indicator of the surface of the BBB (Bourasset et al., 2009; Dagenais et al., 2000). Our results show no significant difference between [^3H]-diazepam Cl_{up} in WT and p25 mice after 3 or 6 weeks ON ($48.45 \pm 5.89 \mu\text{l/g/s}$ in p25 vs. $54.60 \pm 8.00 \mu\text{l/g/s}$ in WT, after 3 weeks ON and $53.93 \pm 12.69 \mu\text{l/g/s}$ in p25 vs. $50.93 \pm 5.46 \mu\text{l/g/s}$ in WT, after 6 weeks ON) (**Fig. 2. B**), suggesting a conserved BBB surface in p25 mice. These results have significant consequences in the way to calculate the brain transport parameters. Indeed, equations 2 and 4 show that the volume of distribution (V_d) and brain uptake (Cl_{up}), are dependent on the amount of [^3H]-substrate in the right brain hemisphere (Q), which is expressed in d.p.m. per gram of brain. As the brain weight is decreased in p25 mice, dividing the total [^3H]-substrate brain amount by the total brain weight will apply a reduction of the weight on both, the brain parenchyma and the brain microvessels. But our data showed that the brain atrophy did not affect the

brain microvessels, suggesting that the brain surface available for drug blood-brain exchange was unchanged between WT and p25 mice. Thus, dividing the total brain amount of the [³H]-substrate by the total brain weight will introduce a bias and a systematic over-estimation of the brain amount of [³H]-substrate. It is why we applied a correction factor to avoid this over-estimation of brain transport parameters and to reliably compare parameters obtained in WT and p25 mice.

Blood-brain barrier physical integrity and brain vascular volume

The physical integrity of the BBB was first assessed by measuring the mRNA amount of tight junction genes (*Tjp1*, *Ocln* and *Cldn5*) by qRT-PCR on WT and p25 brain isolated microvessels. The results showed no difference between mRNA levels of *Ocln* and *Cldn5* of WT and p25 mice after 3 or 6 weeks ON, and a significant increase in mRNA level of *Tjp1* in p25 mice, after 6 weeks ON only, compared to WT mice ($p=0.0034$) (**Fig. 2. C**). These results showed that the tight junctions were still present in the BBB of p25 mice after up to 6 weeks ON, suggesting no alteration of the physical integrity of their BBB. We then measured the brain distribution of a vascular marker, [¹⁴C]-sucrose, in 3 or 6 weeks ON p25 mice, by using the *in situ* brain perfusion technique. All the values were in the normal range (*i.e.* $V_{\text{vasc}} < 20 \mu\text{l/g}$) (Cattelotte et al., 2008; Takasato et al., 1984), confirming that the BBB was not leaky and thus that the physical integrity of the BBB was not altered in p25 mice after 3 or 6 weeks ON (**Fig. 2. D**).

Moreover, the V_{vasc} was not different between WT and p25 mice after 3 weeks ON ($11.73 \pm 3.33 \mu\text{l/g}$ in p25 mice vs. $12.34 \pm 3.02 \mu\text{l/g}$ in WT mice), but was significantly decreased in p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice ($11.70 \pm 2.14 \mu\text{l/g}$ in WT vs. $10.11 \pm 2.20 \mu\text{l/g}$ in p25 mice (-15.2%), $p=0.0041$) (**Fig. 2. D**). To determine whether this decrease was associated with morphological alterations of the BBB, we measured the collagen IV expression, an intrinsic vascular basement membrane component (Thomsen et al., 2017), on coronal brain sections of 6 weeks ON p25 mice and their controls, by immunofluorescence microscopy. Our data showed a significant increase in collagen IV expression in basement membrane of

brain microvessels of p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT (mean fluorescent intensity= 50.11 in p25 mice vs. 36.69 in WT mice (+26,8 %), IC à 95 %: [-33.25 ; -19.31]) (**Fig. 2. E**). These results suggested that the basal membrane of brain microvessels is modified in p25 mice after 6 weeks ON, with an increase in microvessels wall collagen IV deposition, which might reduce the lumen of the microvessels and thus explain the decrease in cerebrovascular volume.

3.3. Glucose transport at the BBB of p25 mice

D-glucose is transported into the brain by saturable, facilitated diffusion involving the GLUT1 (SLC2A1) transporter (Qutub and Hunt, 2005). We found no significant difference in *Slc2a1* mRNA level between WT and p25 mice after 6 weeks ON, by qRT-PCR on brain isolated microvessels ($p= 0.2635$) (**Fig. 3. A**). Consistently with these results, the Glut1 protein expression, measured by immunofluorescence microscopy on coronal brain sections, was not significantly different in WT and p25 mice after 6 weeks ON (mean fluorescent intensity= 39.74 in p25 mice vs. 41.23 in WT mice, IC à 95 %: [-8.593 ; 2.038]) (**Fig. 2. A and Fig. 3. B**).

However, we found a significant decrease in the brain [^3H]-D-glucose Cl_{up} in p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice ($1.17 \pm 0.18 \mu\text{l/g/s}$ in p25 mice vs. $1.41 \pm 0.12 \mu\text{l/g/s}$ in WT mice (-18.6%), $p= 0.0193$) (**Fig. 3. C**).

3.4. Expression and function of Lat1 transporter at the BBB of p25 mice

Phenylalanine is transported into the brain by facilitated, bidirectional diffusion involving the system L-amino acid transporter which includes LAT1 (SLC7A5). We found a significant increase in *Slc7a5* mRNA level, by qRT-PCR on brain isolated microvessels, in p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice ($p= 0.0228$) (**Fig. 4. A**). However, this increase in *Slc7a5* expression was not accompanied by a significant modification of the brain [^3H]-phenylalanine Cl_{up} in p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice ($19.78 \pm 1.02 \mu\text{l/g/s}$ in p25 mice vs. $20.91 \pm 0.68 \mu\text{l/g/s}$ in WT mice, $p= 0.0739$) (**Fig. 4. B**). These results

suggested that this up-regulation of *Slc7a5* in 6 weeks ON p25 mice results in unmodified amino acids transport through the BBB.

4. Discussion

We aimed at studying, for the first time, the physical and functional integrity of the BBB in p25 mice. This mouse model, unlike most transgenic animal models of AD (Oakley et al., 2006; Oddo et al., 2003b, 2003a; Radde et al., 2006; Savonenko et al., 2005), display a robust neuronal loss and a significant brain atrophy (Cruz et al., 2003; Fischer et al., 2005). Our data confirmed that the p25 induction led to significant brain atrophy, as early as 3 weeks from induction initiation. After 6 weeks of p25 induction, we observed a 29% reduction in brain weight which agrees with previous studies showing a 23% reduction of the brain weight and a 25% reduction of the neuronal density in the cortex of p25 mice after 5 weeks ON, compared to WT mice (Brureau et al., 2017). These data suggested that the brain atrophy may be induced by the extensive neuronal death (Brureau et al., 2017; Cruz et al., 2003). Our data support this hypothesis by showing that the p25 brain atrophy was specific to the brain parenchyma and was not associated with a reduction of the brain vasculature, which surface was unchanged in p25 mice, in agreement with previous data reported in two mouse models of AD (APP/PS1 (APP_{sweLon}/PS1_{M146L}) and 3xTg-AD (APP_{swe}/PS1_{M146V}/Tau_{P301L}) (Bourasset et al., 2009; Do et al., 2014).

We also showed that the physical integrity of the BBB was not compromised in p25 mice after up to 6 weeks ON, which means that there is no breakdown of the BBB in p25 mice. This result is consistent with similar studies conducted in mouse models of AD such as APP/PS1 (Do et al., 2014; Poduslo et al., 2001), 3xTg-AD (Bourasset et al., 2009; Do et al., 2014), APOE4 (Alata et al., 2015) but also in mouse model of Tau-mediated neurodegeneration (Jaworski et al., 2011). These data do not support the concept of extensive increase of the BBB permeability in AD (Zlokovic, 2011) and provide useful information on the

pathogenesis of the disease. Indeed, the absence of BBB breakdown suggests, for example, that circulating A β could neither enter nor exit the brain by paracellular diffusion between BCECs and that ND would not be triggered by entry of circulating neurotoxic compounds. In AD patients, however, the question of BBB breakdown is still subject of debate. Indeed, some studies showed a BBB leakage in the brain of patients (Farrall and Wardlaw, 2009; Halliday et al., 2016; van de Haar et al., 2016; Zipser et al., 2007), but, on the contrary, other studies lacked to evidence any alteration of the BBB physical integrity in AD (Alafuzoff et al., 1987; Bronge and Wahlund, 2000; Frölich et al., 1991). These discrepancies might be due to several factors including the experimental method used to explore the human BBB as well as the stage of the pathology. Indeed, most of the studies which have used computed tomography, positron emission tomography or magnetic resonance imaging have shown that the BBB was unaltered (Bronge and Wahlund, 2000; Caserta et al., 1998; Dysken et al., 1990; Schlageter et al., 1987; Starr et al., 2009; Wang et al., 2006) whereas most of the histopathological studies (immunolabeling of albumin, prealbumin, immunoglobulin and fibrinogen) have found a BBB breakdown (Alafuzoff et al., 1983; Berzin et al., 2000; Blennow et al., 1990; Zipser et al., 2007). Moreover, a difference in the stage of the disease between both methods is evident: histopathological studies were conducted on post-mortem samples of patients for which the diagnosis had been confirmed and the pathology was classified as severe, whereas neuroimaging studies were conducted *in vivo*, in patients that fulfilled the criteria for probable AD, which might gather patients with a less advanced AD.

Despite an intact BBB physical integrity, our results evidenced a 15% decrease in the cerebrovascular volume of p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice. Such a reduction in cerebral vascular volume could come from several mechanisms: a reduction in brain vessels density, but we demonstrated that this was not the case in p25 mice, increased tight junctions proteins or vascular morphological abnormalities. In our case, we reported an increase of the *Tjp1* gene and an increase in collagen IV and thus a thickening of the membrane surrounding the BCECs in p25 mice after 6 weeks ON. It has been

previously shown that the basement membrane of brain vessels became thicker with age, with an increase in synthesis and/or a decrease in elimination of its main components, especially collagen IV (Brown and Thore, 2011; Farkas et al., 2006). This thickening of microvessels walls, that seems to be exacerbated in AD (Bouras et al., 2006; Farkas et al., 2000; Kalaria, 2002; Mancardi et al., 1980; Morris et al., 2014; Zarow et al., 1997), ultimately leads to reduction of the vessel lumen and the cerebrovascular volume. Taken together, these BBB modifications might explain the reduction of the cerebrovascular volume we observed. Interestingly, this phenomenon has already been shown in a mouse model of AD, the 3xTg-AD mice, with a 32% increase of the basement membrane thickness (Bourasset et al., 2009). However, the exact opposite phenomenon (*i.e.* unaltered cerebral volume and reduced basement membrane thickness) has been observed in APOE4 mice (Alata et al., 2015), suggesting different ways of BBB regulations depending on the transgenic mouse model. None of the existing models fully reproduces the complete spectrum of this complex disease, which might account for the discordance in results between preclinical and clinical evaluations. Moreover, the vast majority of AD cases are sporadic in humans, and most of animal models rely on the utilization of genetic mutations associated with familial form of the disease (LaFerla and Green, 2012). However, each model allows for the analysis of one or two particular aspects of the disease, which has been very valuable to improve our understanding of the underlying mechanisms of the disease. Hence, APP/PS1 and 3xTg-AD mice are two models of familial AD carrying two or three human mutations, respectively (Dineley et al., 2002; Oddo et al., 2003b), whereas APOE4 mouse model mimics the sporadic form of AD by expressing the main genetic risk factor for AD, the human *APOE* $\epsilon 4$ isoform (Knouff et al., 1999). On the other hand, p25 mice do not directly model the familial or sporadic form of AD, but rather display some important pathological hallmarks of AD, especially a severe ND and Tau pathology. Among transgenic mice that carry mutations of the familial form of the disease, discrepancies seem to come from the nature of the overexpressed pathological proteins (pTau, A β or both). Indeed, similarities in terms of cerebrovascular volume and basement

membrane were observed in 3xTg-AD and p25 mice, which both display increased pTau (Do et al., 2014), whereas APP/PS1 mice, which do not display hyperphosphorylation of Tau, have been shown to have unaltered cerebrovascular volume (Do et al., 2014; Poduslo et al., 2001). Our results support the hypothesis that pTau might be involved in some neurovascular abnormalities in AD (Do et al., 2014). More specifically, pTau seems to exert a toxic effect on the basement membrane of the BBB in AD. Supporting this hypothesis, a relationship between pTau and a constriction of brain microvessels or decrease of cerebrovascular volume has been reported in two mouse models of neurodegeneration (Head et al., 2010; Jaworski et al., 2011).

Besides the physical integrity of the BBB, we also investigated some important functional properties of the BBB of p25 mice after 6 weeks ON, a period for which mice exhibit morphological modifications of the brain vessels and an altered cerebrovascular volume. Regulation of glucose brain uptake, the main source of energy of the brain, is one of the key roles of the BBB (Cunnane et al., 2011). Perturbations of cerebral glucose uptake can greatly impair brain function. Moreover, cerebral glucose hypometabolism is one of the pathophysiological hallmarks of AD (Chen and Zhong, 2013), which correlates with symptoms severity (Landau et al., 2011) and has been proposed for early AD diagnosis (Mosconi, 2005). A down-regulation of GLUT1 expression has been observed in AD patients (Horwood and Davies, 1994; Kalaria and Harik, 1989), but without modification of its mRNA levels (Mooradian et al., 1997). Similarly, we found that the brain uptake of D-glucose was significantly decreased in p25 mice after 6 weeks of p25 induction without any modification of Glut1 protein or gene mRNA expression. These results suggest a loss of function, rather than a down-regulation, of the transporter, which might be explained by a decrease in glucose demand, due to the massive loss of neurons. Do et al. have shown that the D-glucose brain uptake was significantly increased in old (18 months) WT mice, compared to younger WT mice, but not in old 3xTg-AD mice (Do et al., 2014). The measure of Glut1 protein in brain capillaries by western blot confirmed that old WT mice had a significantly higher expression of the transporter than 3xTg-AD

mice at the same age. They hypothesized that an increase in brain D-glucose is part of the normal aging process, probably to compensate for the age-related decreased glucose metabolism. According to this hypothesis, AD mice, such as 3xTg-AD, would thus lack this compensatory mechanism, leading to a decrease of the BBB uptake of D-glucose. Our results support this hypothesis, although the exact mechanism responsible for the decrease in Glut1 function on advanced stage of *p25*-induced ND still needs to be elucidated. Amino acids are nutrients also crucial for CNS function, especially for protein and neurotransmitters synthesis. To our knowledge, functional integrity of the BBB amino acids transport has never been investigated in an AD mouse model. We found that the mRNA level of the gene coding for the amino acids transporter at the BBB (Lat1) was significantly increased in *p25* mice after 6 weeks ON, compared to WT mice. However, the brain uptake of phenylalanine, one of Lat1 substrates, was not different between WT and *p25* mice after 6 weeks ON. The exact mechanism underlying this phenomenon is not fully understood yet, but it can be hypothesized that there might be a modulation of the LAT1 transporter function. Further studies would be necessary to elucidate this question.

5. Conclusions

In conclusion, despite extensive ND, the BBB physical integrity is not altered in *p25* mice after up to 6 weeks of *p25* induction, as previously observed in 3xTg-AD, APP/PS1, APOE4 mice and in tau-mediated ND murine model (Alata et al., 2015; Bourasset et al., 2009; Do et al., 2014; Jaworski et al., 2011; Poduslo et al., 2001). However, other BBB modifications have been observed in *p25* mice, such as a decrease of their cerebrovascular volume associated with an increase of their basement membrane thickness, as it was previously shown in 3xTg-AD and suggested in a mouse model of tau-mediated ND, but not in APP/PS1 nor in APOE4 mice (Alata et al., 2015; Bourasset et al., 2009; Head et al., 2010; Jaworski et al.,

2011). Altogether, our data support the hypothesis of a role of pTau in BBB modifications observed during ND and in particular AD. However, further studies are needed to explore this relationship.

Disclosure/Conflict of interests

This work was supported by Paris Descartes University and SANOFI.

Acknowledgements

We would like to thank Pr. Li-Huei Tsai for the accessibility of the CamKII-TetOp25 mouse model (p25 mice) and the Animal Platform, CRP2 - UMS 3612 CNRS - US25 Inserm-IRD – Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France, for taking care of animals. Confocal imaging was performed at the Cellular and Molecular Imaging facility of the Faculté de Pharmacie de Paris (Inserm US25, CNRS UMS 3612).

References

- Abbott, N.J., 2013. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 437–449. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9608-0>
- Alafuzoff, I., Adolfsson, R., Bucht, G., Winblad, B., 1983. Albumin and immunoglobulin in plasma and cerebrospinal fluid, and blood-cerebrospinal fluid barrier function in patients with dementia of Alzheimer type and multi-infarct dementia. *J. Neurol. Sci.* 60, 465–472.
- Alafuzoff, I., Adolfsson, R., Grundke-Iqbal, I., Winblad, B., 1987. Blood-brain barrier in Alzheimer dementia and in non-demented elderly. An immunocytochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 73, 160–166.
- Alata, W., Ye, Y., St-Amour, I., Vandal, M., Calon, F., 2015. Human apolipoprotein E ϵ 4 expression impairs cerebral vascularization and blood-brain barrier function in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 86–94. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.172>
- Alzheimer, A., 1906. Über einen eigenartigen, schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde. Über Eine Eig. Schwere Krankheit. *Hirnrinde*.
- Assema, D.M. van, Lubberink, M., Rizzu, P., Swieten, J.C. van, Schuit, R.C., Eriksson, J., Scheltens, P., Koeppe, M., Lammertsma, A.A., Berckel, B.N. van, 2012. Blood–brain barrier P-glycoprotein function in healthy subjects and Alzheimer’s disease patients: effect of polymorphisms in the ABCB1 gene. *EJNMMI Res.* 2, 57. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-2-57>
- Bailey, T.L., Rivara, C.B., Rocher, A.B., Hof, P.R., 2004. The nature and effects of cortical microvascular pathology in aging and Alzheimer’s disease. *Neurol. Res.* 26, 573–578. <https://doi.org/10.1179/016164104225016272>
- Berzin, T.M., Zipser, B.D., Rafii, M.S., Kuo-Leblanc, V., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J., Fallon, J.R., Stopa, E.G., 2000. Agrin and microvascular damage in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* 21, 349–355.
- Bian, F., Nath, R., Sobocinski, G., Booher, R.N., Lipinski, W.J., Callahan, M.J., Pack, A., Wang, K.K.-W., Walker, L.C., 2002. Axonopathy, tau abnormalities, and dyskinesia, but no neurofibrillary tangles in p25-transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* 446, 257–266.
- Blennow, K., Wallin, A., Fredman, P., Karlsson, I., Gottfries, C.G., Svennerholm, L., 1990. Blood-brain barrier disturbance in patients with Alzheimer’s disease is related to vascular factors. *Acta Neurol. Scand.* 81, 323–326.
- Block, M.L., Hong, J.-S., 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Prog. Neurobiol.* 76, 77–98. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.004>
- Bouras, C., Kövari, E., Herrmann, F.R., Rivara, C.-B., Bailey, T.L., von Gunten, A., Hof, P.R., Giannakopoulos, P., 2006. Stereologic analysis of microvascular morphology in the elderly: Alzheimer disease pathology and cognitive status. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 235–244. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000203077.53080.2c>
- Bourasset, F., Ouellet, M., Tremblay, C., Julien, C., Do, T.M., Oddo, S., LaFerla, F., Calon, F., 2009. Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Neuropharmacology* 56, 808–813.
- Brightman, M.W., Reese, T.S., 1969. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* 40, 648–677.
- Bronge, L., Wahlund, L.O., 2000. White matter lesions in dementia: an MRI study on blood-brain barrier dysfunction. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 11, 263–267. <https://doi.org/10.1159/000017248>
- Brown, W.R., Thore, C.R., 2011. Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37, 56–74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01139.x>
- Brureau, A., Blanchard-Bregeon, V., Pech, C., Hamon, S., Chaillou, P., Guillemot, J.-C., Barneoud, P., Bertrand, P., Pradier, L., Rooney, T., Schussler, N., 2017. NF-L in cerebrospinal fluid and serum is a biomarker of neuronal damage in an inducible mouse model of neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 104, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.007>

- Campos-Bedolla, P., Walter, F.R., Veszeka, S., Deli, M.A., 2014. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch. Med. Res.* 45, 610–638. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.11.018>
- Caserta, M.T., Caccioppo, D., Lapin, G.D., Ragin, A., Groothuis, D.R., 1998. Blood-brain barrier integrity in Alzheimer's disease patients and elderly control subjects. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 10, 78–84. <https://doi.org/10.1176/jnp.10.1.78>
- Cattelotte, J., André, P., Ouellet, M., Bourasset, F., Scherrmann, J.-M., Cisternino, S., 2008. In situ mouse carotid perfusion model: glucose and cholesterol transport in the eye and brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1449–1459. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.34>
- Chen, Z., Zhong, C., 2013. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog. Neurobiol.* 108, 21–43. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.06.004>
- Cheung, Z.H., Fu, A.K.Y., Ip, N.Y., 2006. Synaptic Roles of Cdk5: Implications in Higher Cognitive Functions and Neurodegenerative Diseases. *Neuron* 50, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.024>
- Cheung, Z.H., Ip, N.Y., 2004. Cdk5: mediator of neuronal death and survival. *Neurosci. Lett.* 361, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.12.117>
- Craggs, L.J.L., Hagel, C., Kuhlenbaumer, G., Borjesson-Hanson, A., Andersen, O., Viitanen, M., Kalimo, H., McLean, C.A., Slade, J.Y., Hall, R.A., Oakley, A.E., Yamamoto, Y., Deramecourt, V., Kalaria, R.N., 2013. Quantitative vascular pathology and phenotyping familial and sporadic cerebral small vessel diseases. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 23, 547–557. <https://doi.org/10.1111/bpa.12041>
- Crews, L., Masliah, E., 2010. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 19, R12–R20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq160>
- Cruz, J.C., Kim, D., Moy, L.Y., Dobbin, M.M., Sun, X., Bronson, R.T., Tsai, L.-H., 2006. p25/Cyclin-Dependent Kinase 5 Induces Production and Intraneuronal Accumulation of Amyloid β In Vivo. *J. Neurosci.* 26, 10536–10541. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3133-06.2006>
- Cruz, J.C., Tseng, H.-C., Goldman, J.A., Shih, H., Tsai, L.-H., 2003. Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40, 471–483.
- Cunnane, S., Nugent, S., Roy, M., Courchesne-Loyer, A., Croteau, E., Tremblay, S., Castellano, A., Pifferi, F., Bocti, C., Paquet, N., Begdouri, H., Bentourkia, M., Turcotte, E., Allard, M., Barberger-Gateau, P., Fulop, T., Rapoport, S.I., 2011. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 27, 3–20. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.07.021>
- Dagenais, C., Rousselle, C., Pollack, G.M., Scherrmann, J.M., 2000. Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 381–386. <https://doi.org/10.1097/00004647-200002000-00020>
- Dauchy, S., Dutheil, F., Weaver, R.J., Chassoux, F., Dumas-Duport, C., Couraud, P.-O., Scherrmann, J.-M., De Waziers, I., Declèves, X., 2008. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood–brain barrier. *J. Neurochem.* 107, 1518–1528. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05720.x>
- Desgranges, B., Baron, J.C., de la Sayette, V., Petit-Taboué, M.C., Benali, K., Landeau, B., Lechevalier, B., Eustache, F., 1998. The neural substrates of memory systems impairment in Alzheimer's disease. A PET study of resting brain glucose utilization. *Brain J. Neurol.* 121 (Pt 4), 611–631.
- Dick, A.P., Harik, S.I., Klip, A., Walker, D.M., 1984. Identification and characterization of the glucose transporter of the blood-brain barrier by cytochalasin B binding and immunological reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 7233.

- Dineley, K.T., Xia, X., Bui, D., Sweatt, J.D., Zheng, H., 2002. Accelerated Plaque Accumulation, Associative Learning Deficits, and Up-regulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Protein in Transgenic Mice Co-expressing Mutant Human Presenilin 1 and Amyloid Precursor Proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 22768–22780.
- Do, T.M., Alata, W., Dodacki, A., Traversy, M.-T., Chacun, H., Pradier, L., Scherrmann, J.-M., Farinotti, R., Calon, F., Bourasset, F., 2014. Altered cerebral vascular volumes and solute transport at the blood-brain barriers of two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 81, 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.02.010>
- Do, T.M., Dodacki, A., Alata, W., Calon, F., Nicolic, S., Scherrmann, J.-M., Farinotti, R., Bourasset, F., 2016. Age-Dependent Regulation of the Blood-Brain Barrier Influx/Efflux Equilibrium of Amyloid- β Peptide in a Mouse Model of Alzheimer's Disease (3xTg-AD). *J. Alzheimers Dis. JAD* 49, 287–300. <https://doi.org/10.3233/JAD-150350>
- Donahue, J.E., Flaherty, S.L., Johanson, C.E., Duncan, J.A., Silverberg, G.D., Miller, M.C., Tavares, R., Yang, W., Wu, Q., Sabo, E., Hovanesian, V., Stopa, E.G., 2006. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 112, 405–415. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0115-3>
- Duyckaerts, C., Delatour, B., Potier, M.-C., 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 118, 5–36. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1>
- Dysken, M.W., Nelson, M.J., Hoover, K.M., Kuskowski, M., McGeachie, R., 1990. Rapid dynamic CT scanning in primary degenerative dementia and age-matched controls. *Biol. Psychiatry* 28, 425–434.
- Farkas, E., De Jong, G.I., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., Luiten, P.G., 2000. Pathological features of cerebral cortical capillaries are doubled in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 100, 395–402.
- Farkas, E., de Vos, R.A.I., Donka, G., Jansen Steur, E.N., Mihály, A., Luiten, P.G.M., 2006. Age-related microvascular degeneration in the human cerebral periventricular white matter. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 111, 150–157. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0007-y>
- Farkas, E., Luiten, P.G.M., 2001. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 64, 575–611. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00068-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00068-X)
- Farrall, A.J., Wardlaw, J.M., 2009. Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease--systematic review and meta-analysis. *Neurobiol. Aging* 30, 337–352. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.015>
- Farrell, C.L., Pardridge, W.M., 1991. Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5779–5783.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Pang, P.T., Lu, B., Tsai, L.-H., 2005. Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory. *Neuron* 48, 825–838. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.033>
- Frölich, L., Kornhuber, J., Ihl, R., Fritze, J., Maurer, K., Riederer, P., 1991. Integrity of the blood-CSF barrier in dementia of Alzheimer type: CSF/serum ratios of albumin and IgG. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 240, 363–366.
- Fuest, C., Bankstahl, M., Winter, P., Helm, M., Pekcec, A., Potschka, H., 2009. In vivo down-regulation of mouse brain capillary P-glycoprotein: A preliminary investigation. *Neurosci. Lett.* 464, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.08.014>
- Gandhi, S., Abramov, A.Y., 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 428010. <https://doi.org/10.1155/2012/428010>
- Grady, C.L., Haxby, J.V., Schlageter, N.L., Berg, G., Rapoport, S.I., 1986. Stability of metabolic and neuropsychological asymmetries in dementia of the Alzheimer type. *Neurology* 36, 1390–1392.
- Gu, X.-L., Long, C.-X., Sun, L., Xie, C., Lin, X., Cai, H., 2010. Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. *Mol. Brain* 3, 12. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-12>

- Guo, X., Geng, M., Du, G., 2005. Glucose transporter 1, distribution in the brain and in neural disorders: its relationship with transport of neuroactive drugs through the blood-brain barrier. *Biochem. Genet.* 43, 175–187.
- Halliday, M.R., Rege, S.V., Ma, Q., Zhao, Z., Miller, C.A., Winkler, E.A., Zlokovic, B.V., 2016. Accelerated pericyte degeneration and blood-brain barrier breakdown in apolipoprotein E4 carriers with Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 216–227. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.44>
- Haxby, J.V., Grady, C.L., Koss, E., Horwitz, B., Heston, L., Schapiro, M., Friedland, R.P., Rapoport, S.I., 1990. Longitudinal study of cerebral metabolic asymmetries and associated neuropsychological patterns in early dementia of the Alzheimer type. *Arch. Neurol.* 47, 753–760.
- Head, B.P., Peart, J.N., Panneerselvam, M., Yokoyama, T., Pearn, M.L., Niesman, I.R., Bonds, J.A., Schilling, J.M., Miyanohara, A., Headrick, J., Ali, S.S., Roth, D.M., Patel, P.M., Patel, H.H., 2010. Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging. *PloS One* 5, e15697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015697>
- Heneka, M.T., Carson, M.J., El Khoury, J., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschy, S.A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhatsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C.A., Breitner, J.C., Cole, G.M., Golenbock, D.T., Kummer, M.P., 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 14, 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Hooijmans, C.R., Graven, C., Dederen, P.J., Tanila, H., van Groen, T., Kiliaan, A.J., 2007. Amyloid beta deposition is related to decreased glucose transporter-1 levels and hippocampal atrophy in brains of aged APP/PS1 mice. *Brain Res.* 1181, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.063>
- Horwood, N., Davies, D.C., 1994. Immunolabelling of hippocampal microvessel glucose transporter protein is reduced in Alzheimer's disease. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 425, 69–72.
- Iadecola, C., 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 347–360. <https://doi.org/10.1038/nrn1387>
- Iba, M., Guo, J.L., McBride, J.D., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2013. Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 1024–1037. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-12.2013>
- Jaworski, T., Lechat, B., Demedts, D., Gielis, L., Devijver, H., Borghgraef, P., Duimel, H., Verheyen, F., Kügler, S., Van Leuven, F., 2011. Dendritic degeneration, neurovascular defects, and inflammation precede neuronal loss in a mouse model for tau-mediated neurodegeneration. *Am. J. Pathol.* 179, 2001–2015. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.025>
- Jeynes, B., Provias, J., 2008. Evidence for altered LRP/RAGE expression in Alzheimer lesion pathogenesis. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 432–437.
- Kalaria, R.N., 2002. Small vessel disease and Alzheimer's dementia: pathological considerations. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 13 Suppl 2, 48–52. <https://doi.org/49150>
- Kalaria, R.N., Harik, S.I., 1989. Reduced glucose transporter at the blood-brain barrier and in cerebral cortex in Alzheimer disease. *J. Neurochem.* 53, 1083–1088.
- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K. i, Uchino, H., Takeda, E., Endou, H., 1998. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* 273, 23629–23632.
- Katzman, R., 1986. Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 314, 964–973. <https://doi.org/10.1056/NEJM198604103141506>
- Kim, G.H., Kim, J.E., Rhie, S.J., Yoon, S., 2015. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp. Neurobiol.* 24, 325–340. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>

- Knouff, C., Hinsdale, M.E., Mezdoor, H., Altenburg, M.K., Watanabe, M., Quarfordt, S.H., Sullivan, P.M., Maeda, N., 1999. Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *J. Clin. Invest.* 103, 1579–1586. <https://doi.org/10.1172/JCI6172>
- Ko, J., Humbert, S., Bronson, R.T., Takahashi, S., Kulkarni, A.B., Li, E., Tsai, L.H., 2001. p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 6758–6771.
- Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci., Special Issue: Glial Signalling* 19, 312–318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)
- LaFerla, F.M., Green, K.N., 2012. Animal Models of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006320>
- Landau, S.M., Harvey, D., Madison, C.M., Koeppe, R.A., Reiman, E.M., Foster, N.L., Weiner, M.W., Jagust, W.J., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2011. Associations between cognitive, functional, and FDG-PET measures of decline in AD and MCI. *Neurobiol. Aging* 32, 1207–1218. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.07.002>
- Lee, K.Y., Clark, A.W., Rosales, J.L., Chapman, K., Fung, T., Johnston, R.N., 1999. Elevated neuronal Cdc2-like kinase activity in the Alzheimer disease brain. *Neurosci. Res.* 34, 21–29.
- Lew, J., Huang, Q.Q., Qi, Z., Winkfein, R.J., Aebbersold, R., Hunt, T., Wang, J.H., 1994. A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371, 423–426. <https://doi.org/10.1038/371423a0>
- Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>
- Mancardi, G.L., Perdeli, F., Rivano, C., Leonardi, A., Bugiani, O., 1980. Thickening of the basement membrane of cortical capillaries in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 49, 79–83.
- Marie-Claire, C., Courtin, C., Roques, B.P., Noble, F., 2004. Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 29, 2208–2215. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300513>
- Mattson, M.P., LaFerla, F.M., Chan, S.L., Leissring, M.A., Shepel, P.N., Geiger, J.D., 2000. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 23, 222–229. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01548-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01548-4)
- Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y.Y., Wang, L., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., 1996. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274, 1678–1683.
- Minogue, A.M., Jones, R.S., Kelly, R.J., McDonald, C.L., Connor, T.J., Lynch, M.A., 2014. Age-associated dysregulation of microglial activation is coupled with enhanced blood-brain barrier permeability and pathology in APP/PS1 mice. *Neurobiol. Aging* 35, 1442–1452. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.026>
- Montagne, A., Barnes, S.R., Sweeney, M.D., Halliday, M.R., Sagare, A.P., Zhao, Z., Toga, A.W., Jacobs, R.E., Liu, C.Y., Amezcua, L., Harrington, M.G., Chui, H.C., Law, M., Zlokovic, B.V., 2015. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* 85, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.032>
- Mooradian, A.D., Chung, H.C., Shah, G.N., 1997. GLUT-1 Expression in the Cerebra of Patients with Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Aging* 18, 469–474. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)00111-5](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)00111-5)
- Morris, A.W.J., Carare, R.O., Schreiber, S., Hawkes, C.A., 2014. The Cerebrovascular Basement Membrane: Role in the Clearance of β -amyloid and Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front. Aging Neurosci.* 6, 251. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00251>
- Mosconi, L., 2005. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 32, 486–510. <https://doi.org/10.1007/s00259-005-1762-7>

- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Veeranna, null, Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahljianian, M., Lau, L.-F., Duff, K., 2003. Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* 38, 555–565.
- Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., Vassar, R., 2006. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 10129–10140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., LaFerla, F.M., 2003a. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 1063–1070.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003b. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.
- Patrick, G.N., Zukerberg, L., 1999. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615.
- Poduslo, J.F., Curran, G.L., Wengenack, T.M., Malester, B., Duff, K., 2001. Permeability of proteins at the blood-brain barrier in the normal adult mouse and double transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 8, 555–567. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0402>
- Popugaeva, E., Pchitskaya, E., Bezprozvanny, I., 2017. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease – A therapeutic opportunity? *Biochem. Biophys. Res. Commun., SI: Neurodegeneration* 483, 998–1004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.053>
- Qutub, A.A., Hunt, C.A., 2005. Glucose transport to the brain: a systems model. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 49, 595–617. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.03.002>
- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S.A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M.E., Jäggli, F., Wolburg, H., Gengler, S., Haass, C., Ghetti, B., Czech, C., Hölscher, C., Mathews, P.M., Jucker, M., 2006. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 7, 940–946. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400784>
- Savonenko, A., Xu, G.M., Melnikova, T., Morton, J.L., Gonzales, V., Wong, M.P.F., Price, D.L., Tang, F., Markowska, A.L., Borchelt, D.R., 2005. Episodic-like memory deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol. Dis.* 18, 602–617. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.10.022>
- Schlageter, N.L., Carson, R.E., Rapoport, S.I., 1987. Examination of blood-brain barrier permeability in dementia of the Alzheimer type with [68Ga]EDTA and positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1987.1>
- Shawahna, R., Uchida, Y., Declèves, X., Ohtsuki, S., Yousif, S., Dauchy, S., Jacob, A., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P.-O., Terasaki, T., Scherrmann, J.-M., 2011. Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol. Pharm.* 8, 1332–1341. <https://doi.org/10.1021/mp200129p>
- Shukla, V., Seo, J., Binukumar, B.K., Amin, N.D., Reddy, P., Grant, P., Kuntz, S., Kesavapany, S., Steiner, J., Mishra, S.K., Tsai, L.-H., Pant, H.C., 2017. TFP5, a Peptide Inhibitor of Aberrant and Hyperactive Cdk5/p25, Attenuates Pathological Phenotypes and Restores Synaptic Function in CK-p25Tg Mice. *J. Alzheimers Dis.* 56, 335–349. <https://doi.org/10.3233/JAD-160916>
- Smith, Q.R., 1996. Brain perfusion systems for studies of drug uptake and metabolism in the central nervous system. *Pharm. Biotechnol.* 8, 285–307.
- Smith, Q.R., Momma, S., Aoyagi, M., Rapoport, S.I., 1987. Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 49, 1651–1658.

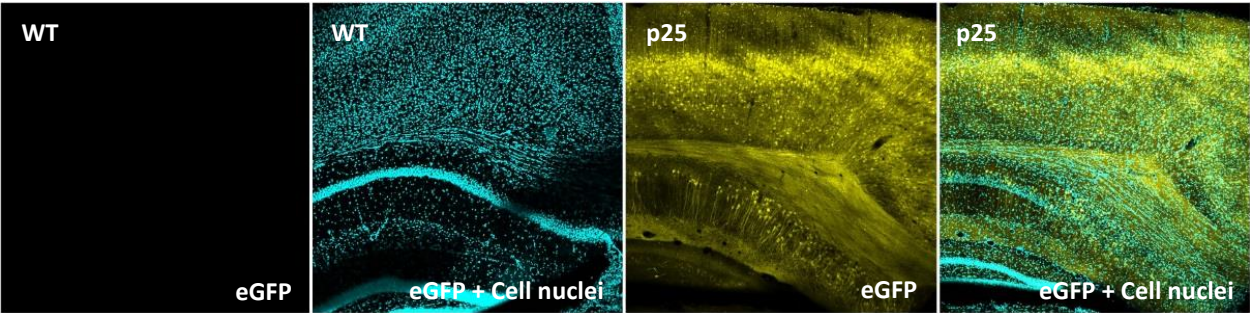
- Starr, J.M., Farrall, A.J., Armitage, P., McGurn, B., Wardlaw, J., 2009. Blood-brain barrier permeability in Alzheimer's disease: a case-control MRI study. *Psychiatry Res.* 171, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2008.04.003>
- Swatton, J.E., Sellers, L.A., Faull, R.L.M., Holland, A., Iritani, S., Bahn, S., 2004. Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2711–2719. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03365.x>
- Takasato, Y., Rapoport, S.I., Smith, Q.R., 1984. An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am. J. Physiol.* 247, H484–493.
- Takashima, A., Murayama, M., Yasutake, K., Takahashi, H., Yokoyama, M., Ishiguro, K., 2001. Involvement of cyclin dependent kinase5 activator p25 on tau phosphorylation in mouse brain. *Neurosci. Lett.* 306, 37–40. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01864-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01864-X)
- Tang, D., Yeung, J., Lee, K.Y., Matsushita, M., Matsui, H., Tomizawa, K., Hatase, O., Wang, J.H., 1995. An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. *J. Biol. Chem.* 270, 26897–26903.
- Thomsen, M.S., Routhe, L.J., Moos, T., 2017. The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 3300–3317. <https://doi.org/10.1177/0271678X17722436>
- Tsai, L.H., Delalle, I., Caviness, V.S., Chae, T., Harlow, E., 1994. p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371, 419–423. <https://doi.org/10.1038/371419a0>
- Tseng, H.C., Zhou, Y., Shen, Y., Tsai, L.H., 2002. A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains. *FEBS Lett.* 523, 58–62.
- van de Haar, H.J., Burgmans, S., Jansen, J.F.A., van Osch, M.J.P., van Buchem, M.A., Muller, M., Hofman, P.A.M., Verhey, F.R.J., Backes, W.H., 2016. Blood-Brain Barrier Leakage in Patients with Early Alzheimer Disease. *Radiology* 281, 527–535. <https://doi.org/10.1148/radiol.2016152244>
- Vliet, V., A, E., da Costa Araújo, S., Redeker, S., van Schaik, R., Aronica, E., Gorter, J.A., 2007. Blood–brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* 130, 521–534. <https://doi.org/10.1093/brain/awl318>
- Wang, H., Golob, E.J., Su, M.-Y., 2006. Vascular volume and blood-brain barrier permeability measured by dynamic contrast enhanced MRI in hippocampus and cerebellum of patients with MCI and normal controls. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* 24, 695–700. <https://doi.org/10.1002/jmri.20669>
- Wang, X., Michaelis, E.K., 2010. Selective Neuronal Vulnerability to Oxidative Stress in the Brain. *Front. Aging Neurosci.* 2. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00012>
- www.imagej.net, n.d. ImageJ/Fiji [en ligne] <<https://imagej.net/Fiji>>, consulté le 24-10-2017. [WWW Document]. URL <https://imagej.net/Fiji>
- Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Bai, J., Rasquinha, I., Smith, C., Pei, K., Walker, D., Lue, L.-F., Stanimirovic, D., Zhang, W., 2009. ABCG2 is up-regulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for A β 1-40 peptides. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 5463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5103-08.2009>
- Yousif, S., Marie-Claire, C., Roux, F., Scherrmann, J.-M., Declèves, X., 2007. Expression of drug transporters at the blood-brain barrier using an optimized isolated rat brain microvessel strategy. *Brain Res.* 1134, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.11.089>
- Zarow, C., Barron, E., Chui, H.C., Perlmuter, L.S., 1997. Vascular basement membrane pathology and Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 826, 147–160.
- Zipser, B.D., Johanson, C.E., Gonzalez, L., Berzin, T.M., Tavares, R., Hulette, C.M., Vitek, M.P., Hovanesian, V., Stopa, E.G., 2007. Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 28, 977–986. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.016>

- Zlokovic, B.V., 2011. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 723–738. <https://doi.org/10.1038/nrn3114>
- Zlokovic, B.V., 2008. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 57, 178–201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>
- Zlokovic, B.V., 2005. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.02.001>

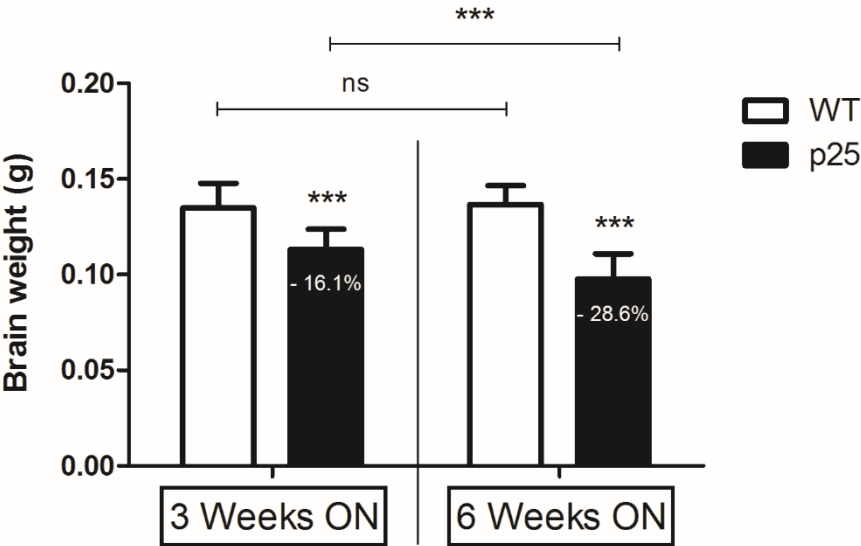
Figures

Fig. 1. Expression of eGFP-tagged p25 protein and brain atrophy in p25 mice.

A.



B.

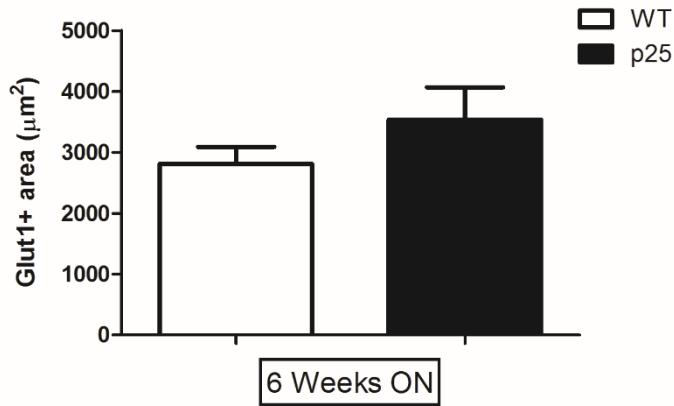
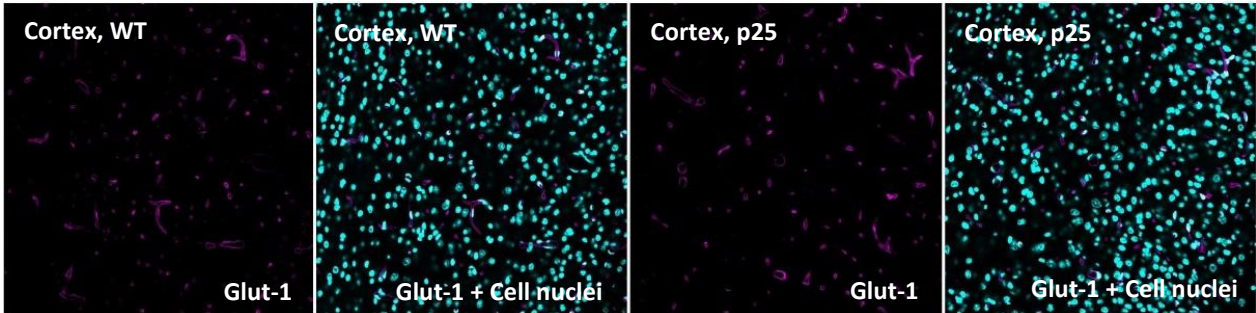


(A) Efficacy of the *p25-eGFP* transgene induction was controlled by immunohistofluorescence microscopy, using anti-eGFP antibodies (yellow) on coronal brain sections (50 μm) of WT and p25 mice after 6 weeks of *p25* induction (6 weeks ON). Cell nuclei were counterstained with TOPRO-3 (cyan). (B) Brain atrophy was evaluated by measuring the right brain hemisphere weight of WT and p25 mice after 3

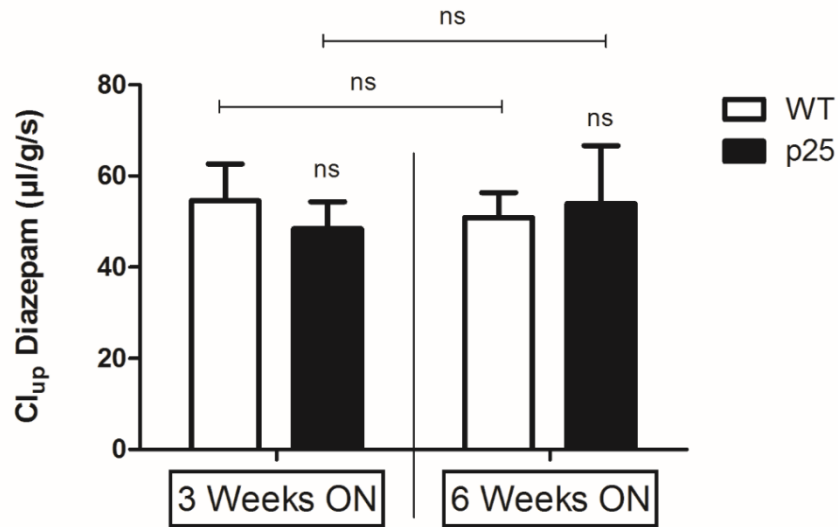
and 6 weeks ON. P25 mice showed a significant decrease in right brain hemisphere weight after 3 and 6 weeks ON, compared to WT mice. Data represent the mean $\pm$ SD. A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-test was used to identify significant differences (** $p < 0.001$, ns = not significant). N = 50 to 52 mice.

Fig. 2. Physical integrity of the cerebrovascular tree in p25 mice.

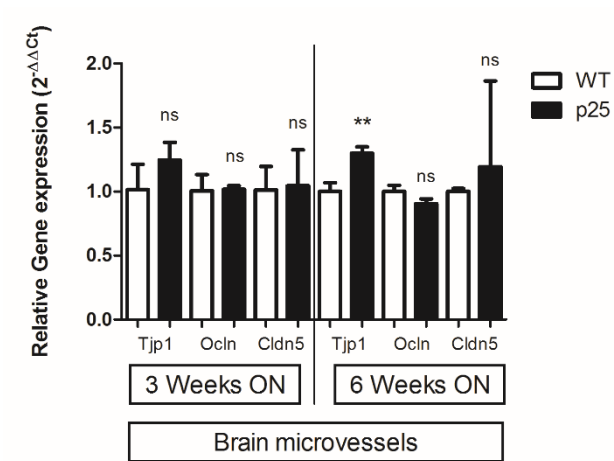
A.



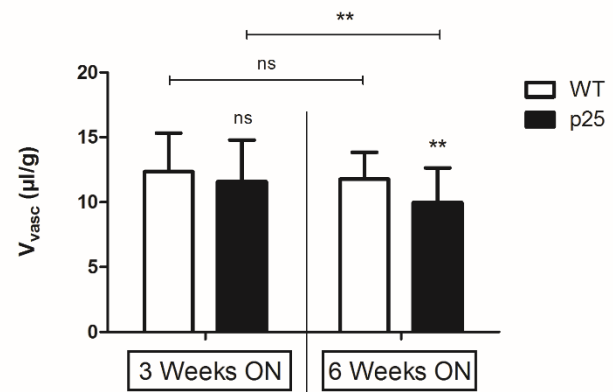
B.



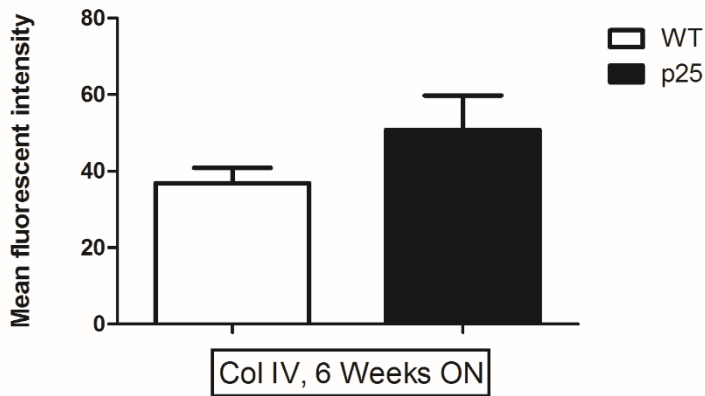
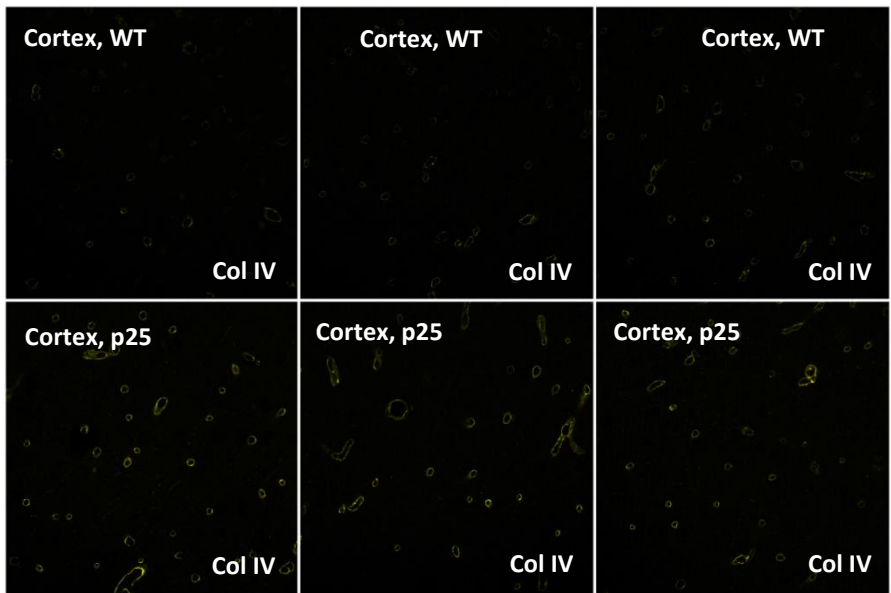
C.



D.



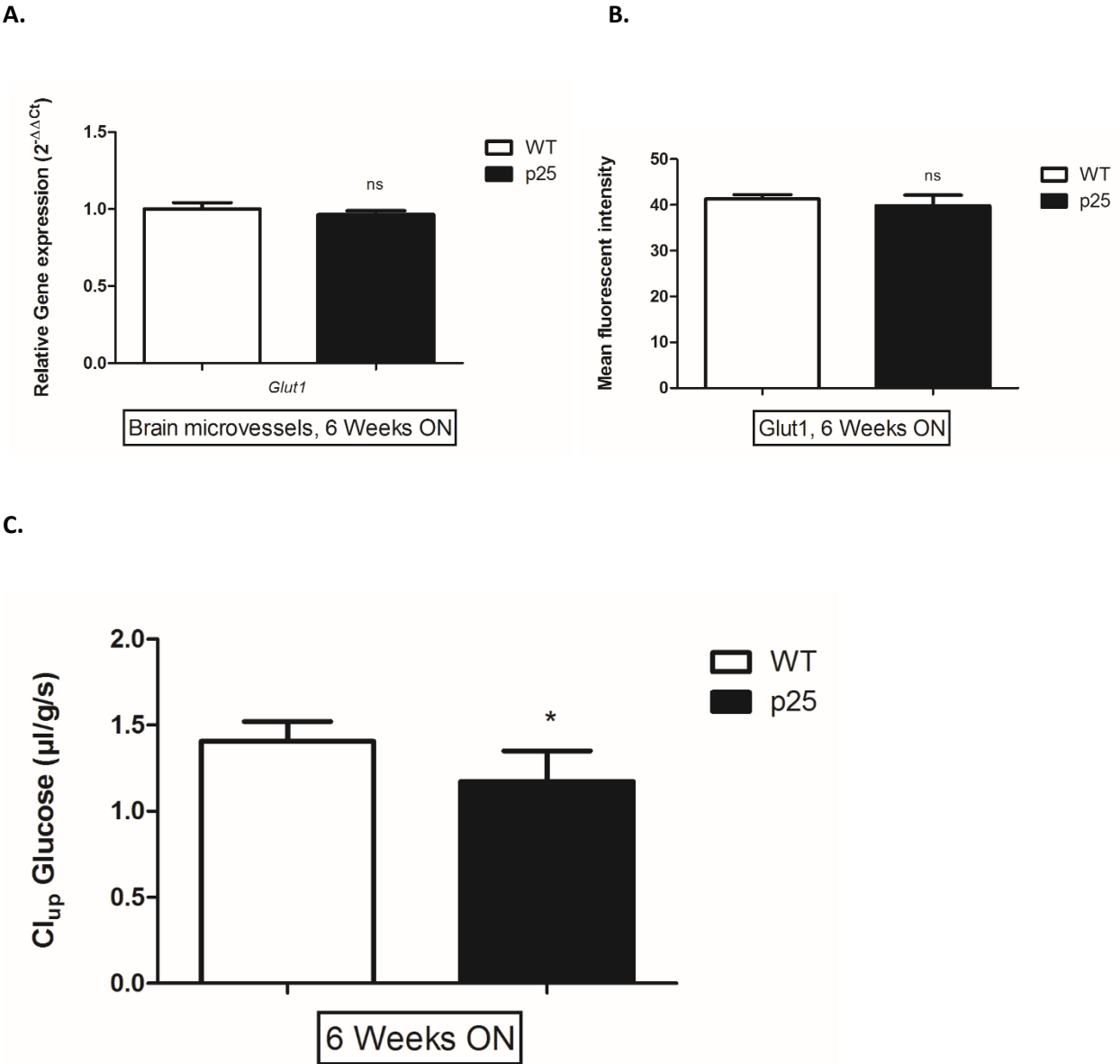
E.



(A) The Glut1+ area (μm^2) in a constant field of view within the cortex was measured by immunofluorescence microscopy, using anti-Glut1 antibodies (magenta) on coronal brain sections (50 μm) of WT and p25 mice after 6 weeks ON. Cell nuclei were counterstained with TOPRO-3 (cyan). Images analysis showed a significant increase in the apparent brain vessels density in p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice (Glut1+ area= 3464 μm^2 in p25 mice vs. 2771 μm^2 in WT mice, IC à 95 %: [4.6 ; 47.92]). Data represent the mean $\pm$ SD and were analyzed using a linear mixed model on log-transformed values. N = 3 mice (12 images per mouse). (B) The passive diffusion through the blood-brain barrier of WT and p25 mice after 3 and 6 weeks ON was measured by *in situ* brain perfusion. The brain uptake clearance (Cl_{up} $\mu\text{l/g/s}$) of [^3H]-diazepam, measured in the right cortex, was not significantly different between p25 and WT mice, after 3 or 6 weeks ON. Data represent the mean $\pm$ SD. A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-test was used to identify significant differences (ns = not significant). N = 7 mice. (C) mRNA levels of the genes coding for tight junction proteins (*Tjp1*, *Ocln* and *Cldn5*) were determined by qRT-PCR on WT and p25 brain isolated microvessels. Data presented are normalized to β -actin and analyzed using the comparative Ct method ($\Delta\Delta\text{Ct}$) to calculate relative gene expression. Gene expression of tight junction proteins in brain microvessels was not significantly different between p25 and WT mice after 3 and 6 weeks ON. Data represent the mean $\pm$ SD. A t-test was used to identify significant differences between p25 and WT mice for each gene (**p < 0.01, ns = not significant). N = 3 pools of 4 to 6 mouse brains each. (D) The cerebrovascular volume of WT and p25 mice after 3 and 6 weeks ON was measured by *in situ* brain perfusion. The brain distribution volume of [^3H]-sucrose (V_{vasc} , $\mu\text{l/g}$), was unchanged after 3 weeks ON but was significantly decreased in p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice. Data represent the mean $\pm$ SD. A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-test was used to identify significant differences (**p < 0.01, ns = not significant). N = 50 to 52 mice. (E) Collagen IV (Col IV) expression in basement membrane of brain microvessels determined by immunofluorescence microscopy, using anti-Col IV antibodies (yellow) on

coronal brain sections (50 μm) of WT and p25 mice after 6 weeks ON. Quantification of Col IV expression was estimated by mean pixel fluorescent intensity measurement. There was a significant increase in Col IV expression in the basement membrane of brain microvessels of p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice (mean fluorescent intensity= 50.11 in p25 mice vs. 36.69 in WT mice (-26,8 %), IC à 95 %: [-33.25 ; -19.31]). Data represent the mean $\pm$ SD and were analyzed using a linear mixed model on log-transformed values. N = 3 mice (8 images per mouse).

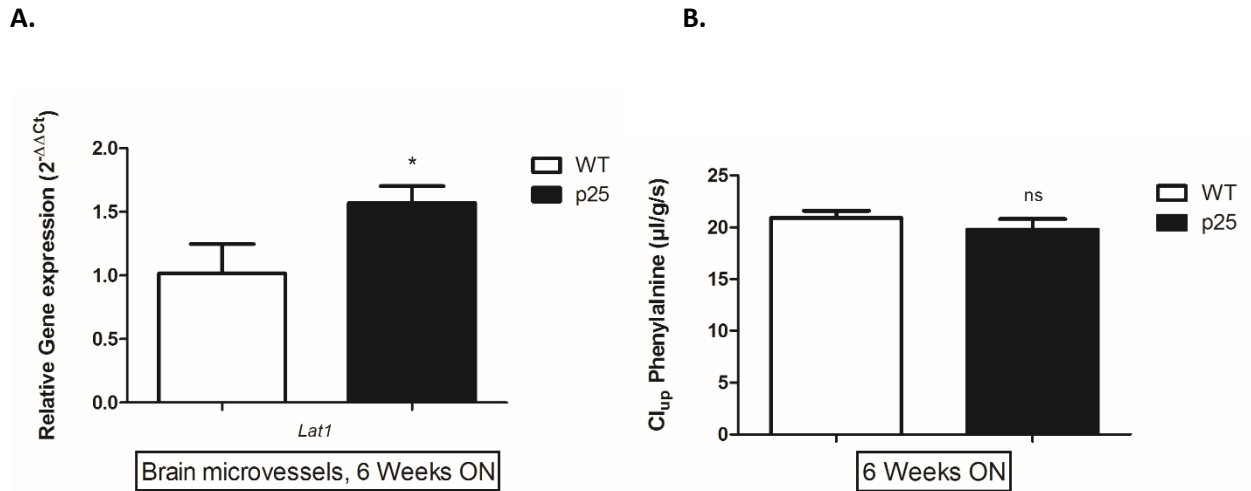
Fig. 3. Glucose transport at the blood-brain barrier of p25 mice.



(A) mRNA level of the gene coding for the glucose transporter (*Slc2a1*) was determined by qRT-PCR on WT and p25 brain isolated microvessels. Data presented are normalized to β -actin and analyzed using the comparative Ct method ($\Delta\Delta Ct$) to calculate relative gene expression. Gene expression of Glut1 in brain microvessels was not significantly different between p25 and WT mice after 6 weeks ON. Data represent the mean $\pm$ SD. A t-test was used to identify significant differences between p25 and WT mice (ns = not

significant). N = 3 pools of 4 to 6 mouse brains each. **(B)** Glut1 expression in brain microvessels was determined by immunofluorescence microscopy, using anti-Glut1 antibodies (see Fig. 2 (A)) on coronal brain sections (50 μ m) of WT and p25 mice after 6 weeks ON. Quantification of Glut1 expression was estimated by mean pixel fluorescent intensity measurement. There was no significant difference in Glut1 microvessels expression between p25 and WT mice after 6 weeks ON (mean fluorescent intensity= 39.74 in p25 mice vs. 41.23 in WT mice, IC à 95 %: [-8.593 ; 2.038]). Data represent the mean $\pm$ SD and were analyzed using a linear mixed model on log-transformed values. N = 3 mice (12 images per mouse). **(C)** The D-glucose receptor-mediated diffusion through the blood-brain barrier of WT and p25 mice after 6 weeks ON was measured by *in situ* brain perfusion. The brain uptake clearance (Cl_{up} μ l/g/s) of [^{3} H]-Deoxy-D-glucose, measured in the right hemisphere, was significantly decreased in p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice. Data represent the mean $\pm$ SD. A t-test was used to identify significant differences (*p < 0.05). N = 7 mice.

Fig. 4. Phenylalanine transport at the blood-brain barrier of p25 mice.



(A) mRNA level of the gene coding for the amino acid transporter (*Slc7a5*) was determined by qRT-PCR on WT and p25 brain isolated microvessels. Data presented are normalized to β -actin and analyzed using the comparative Ct method ($\Delta\Delta Ct$) to calculate relative gene expression. Gene expression of Lat1 in brain microvessels was significantly higher p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice. Data represent the mean $\pm$ SD. A t-test was used to identify significant differences between p25 and WT mice (* $p < 0.05$). N = 3 pools of 4 to 6 mouse brains each. **(B)** The phenylalanine receptor-mediated diffusion through the blood-brain barrier of WT and p25 mice after 6 weeks ON was measured by *in situ* brain perfusion. The brain uptake clearance (Cl_{up} $\mu\text{l/g/s}$) of [^3H]-phenylalanine, was not significantly different between p25 and WT mice after 6 weeks ON. Data represent the mean $\pm$ SD. A t-test was used to identify significant differences between p25 and WT mice (ns = not significant). N = 7 mice.

Tables

Table 1: Primers sequences used for qRT-PCR assay.

Gene	Protein	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Length (bp)
<i>eGFP</i>	eGFP	CGGCAAGCTGACCCTGAAG	GGTAGCGGCTGAAGCACTG	88
<i>Tjp1</i>	ZO-1	TGCTGGCCCTAAACCTGTCC	TTCGGGTGGCTTCACTTGAGG	99
<i>Cldn5</i>	Claudin-5	CGTCGGGTGAGCATTCACTCT	ACACGCCAGGATCAAGCC	102
<i>Ocln</i>	Occludin	CTACTGTGTGGTTGATCCCCAGG	CTTTCTTCGGGTTTTACAGCAA	105
<i>Slc2a1</i>	Glut1	ATCGTCGTTGGCATCCTTATTGC	GCAGGGCTGGGATGAAGATG	105
<i>Slc7a5</i>	Lat1	CCCTGGCCCTCATCATTTTGC	CCCCACGTCCAGATTGGT	115

Table 2: Primary and secondary antibodies used for immunohistofluorescence assay

Primary antibodies			
Antibody against	Supplier	Description (Isotype)	Dilution
GFP	Abcam, UK	Chicken polyclonal (IgY)	1/500
Glut1	Merck Millipore, France	Rabbit polyclonal (IgG)	1/200
Type IV collagen	CliniSciences, France	Goat polyclonal (IgG)	1/400
Secondary antibodies (dilution = 1/500)			
Antibody against	Supplier	Description (Isotype)	Conjugate
Chicken IgY	Invitrogen, USA	Goat polyclonal (IgG)	Alexa Fluor® 555
Rabbit IgG	Invitrogen, USA	Goat polyclonal (IgG)	Alexa Fluor® 555
Goat IgG	ThermoFisher Scientific, USA	Donkey (IgG)	Alexa Fluor® 488

**2^{ème} partie: Etude de l'impact des
modifications fonctionnelles de la
barrière hémato-encéphalique sur le
passage d'un candidat médicament à
visée cérébrale dans un contexte de
neurodégénérescence**

Article 2

Article 2: High brain distribution of a new central nervous system drug candidate despite its P-glycoprotein-mediated efflux at the mouse blood-brain barrier.

C. Taccola, S. Cartot-Cotton, D. Valente, P. Barneoud, C. Aubert, V. Boutet, F. Gallen, M. Lochus, S. Nolic, A. Dodacki, M. Smirnova, S. Cisternino, X. Declèves, F. Bourasset

Article publié dans le journal « European Journal of Pharmaceutical Sciences ».

Introduction et Objectifs

Pour atteindre leurs cibles, les médicaments à visée cérébrale doivent impérativement traverser la BHE et résider en concentration suffisante dans le parenchyme cérébral pour pouvoir exercer leur activité pharmacologique. La présence de JS entre les CECCs et de pompes d'efflux à leur pôle luminal garantit la faible perméabilité de la BHE et limite fortement la pénétration dans le CNS des xénobiotiques. L'une des questions que nous nous posions était de savoir si la pathologie, notamment celle induite chez les souris p25, pouvait modifier les caractéristiques de transport à travers la BHE d'une petite molécule lipophile (cLogP= 5,1) inhibitrice de la voie PKR (PKRinh). Afin de pouvoir répondre à cet objectif ([Article 3](#)), nous devions d'abord caractériser les mécanismes de passage cérébral de cette molécule ainsi que sa pharmacocinétique plasmatique et cérébrale, en condition non pathologique. Ce travail fait l'objet de l'[Article 2](#).

Méthodes

Nous avons utilisé deux approches ; d'une part l'étude pharmacocinétique conventionnelle, chez la souris, de PKRinh à trois doses (10, 30 et 100 mg/kg administrées par voie orale, en doses uniques et répétées pendant 4 jours), et d'autre part la technique de perfusion cérébrale *in situ* pour explorer plus spécifiquement les mécanismes de transport mis en jeu à la BHE chez la souris saine. Nous avons également utilisé des souris triple KO (TKO) n'exprimant ni la P-gp ni la Bcrp (*Abcb1a*^{-/-}/*Abcb1b*^{-/-}/*Abcg2*^{-/-}), afin de déterminer l'implication de ces transporteurs dans l'efflux cérébral de PKRinh.

Principaux résultats

Les résultats de l'étude pharmacocinétique conventionnelle aux trois doses (10, 30 et 100 mg/kg) a montré que PKRinh présentait une non-linéarité pharmacocinétique plasmatique suite à son administration par voie orale qui n'était pas retrouvée au niveau cérébral. Nous avons ensuite montré que la partition cerveau-plasma de la fraction libre ($K_{p,u,u,brain}$) de PKRinh était inférieure à 1 à toutes les doses de l'étude. Ces deux résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme d'efflux actif à la BHE. Les résultats de l'étude de perfusion cérébrale *in situ* ont révélé que PKRinh présentait une clairance d'entrée cérébrale élevée ($Cl_{up} = 13.8 \pm 3.1 \mu\text{l/g/s}$) qui augmentait avec la concentration de PKRinh dans le perfusat pour atteindre une valeur maximale de $58.0 \pm 5.0 \mu\text{l/g/s}$, proche de celle obtenue avec une molécule diffusant librement à travers la BHE tel le diazépam. Notre modélisation de la vitesse d'entrée cérébrale de PKRinh en fonction de sa concentration a permis de mettre en évidence que son transport était constitué d'une composante passive et d'une composante d'efflux, active et saturable ($K_m \approx 3 \mu\text{M}$ et $V_{max} \approx 0,4 \text{ nmol/g/s}$). L'utilisation des souris TKO avec et sans inhibiteur de P-gp a permis d'identifier la P-gp comme étant l'unique transporteur d'efflux de PKRinh à la BHE. Enfin, nous avons montré que PKRinh est un très bon substrat de la P-gp, du fait de son rapport d'efflux élevé (rapport d'efflux ≈ 4).

Conclusion

Nous avons montré que le passage de la BHE de PKRinh est un processus complexe composé d'une diffusion passive, du sang vers le cerveau, probablement associée à sa grande lipophilie, et d'un efflux actif, du cerveau vers le sang, médié par la P-gp. Mais, malgré son caractère substrat de la P-gp, PKRinh possède une clairance d'entrée cérébrale relativement élevée, jamais retrouvée pour d'autres substrats de la P-gp ayant un rapport d'efflux similaire (*i.e.* $= 4$). Nos résultats démontrent également que l'efflux de PKRinh par la P-gp n'est pas saturé lorsque PKRinh est administré par voie orale chez la souris aux doses de 10 à 100 mg/kg, ce qui explique la distribution cérébrale linéaire de PKRinh en dépit de sa non-linéarité plasmatique aux doses de l'étude.



High brain distribution of a new central nervous system drug candidate despite its P-glycoprotein-mediated efflux at the mouse blood-brain barrier

Camille Taccola^{a,f,g,h,1,2,3}, Sylvaine Cartot-Cotton^{a,1}, Delphine Valente^{b,1}, Pascal Barneoud^{c,4}, Catherine Aubert^{d,1}, Valérie Boutet^{d,1}, Fabienne Gallen^{e,1}, Murielle Lochus^{f,g,h,2,3}, Sophie Nicolic^{f,g,h,2,3}, Agnès Dodacki^{f,g,h,2,3}, Maria Smirnova^{f,g,h,2,3}, Salvatore Cisternino^{f,g,h,2,3}, Xavier Declèves^{f,g,h,2,3}, Fanchon Bourasset^{f,g,h,2,3}

^a Pharmacokinetics, Dynamics and Metabolism, Translational Medicine & Early Development, Sanofi, France

^b Drug Metabolism & Pharmacokinetics, Research Platform, Sanofi, France

^c Neuroscience Therapeutic Area, Sanofi, France

^d Biomarkers & Clinical Bioanalysis, Translational Medicine & Early Development, Sanofi, France

^e Animal Research Welfare, Research Platform, Sanofi, France

^f Variabilité de Réponse aux Psychotropes, Inserm, U1144, Paris F-75006, France

^g Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, UMR-S 1144, Paris F-75006, France

^h Université Paris Diderot, UMR-S 1144, Paris F-75013, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Blood-brain barrier
Brain distribution
P-gp efflux
Pharmacokinetics
In situ brain perfusion

ABSTRACT

Efficacy of drugs aimed at treating central nervous system (CNS) disorders rely partly on their ability to cross the cerebral endothelium, also called the blood-brain barrier (BBB), which constitutes the main interface modulating exchanges of compounds between the brain and blood. In this work, we used both, conventional pharmacokinetics (PK) approach and *in situ* brain perfusion technique to study the blood and brain PK of PKRinh, an inhibitor of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) activation, in mice. PKRinh showed a supra dose-proportional blood exposure that was not observed in the brain, and a brain to blood AUC ratio of unbound drug smaller than 1 at all tested doses. These data suggested the implication of an active efflux at the BBB. Using *in situ* brain perfusion technique, we showed that PKRinh has a very high brain uptake clearance which saturates with increasing concentrations. Fitting the data to a Michaelis-Menten equation revealed that PKRinh transport through the BBB is composed of a passive unsaturable flux and an active saturable protein-mediated efflux with a K_m of $\approx 3 \mu\text{M}$. We were able to show that the ATP-binding cassette (ABC) transporter P-gp (Abcb1), but not Bcrp (Abcg2), was involved in the brain to blood efflux of PKRinh. At the circulating PKRinh concentrations of this study, the P-gp was not saturated, in accordance with the linear brain PKRinh PK. Finally, PKRinh had high brain uptake clearance ($14 \mu\text{L/g/s}$) despite it is a good P-gp substrate (P-gp Efflux ratio ≈ 3.6), and reached similar values than the cerebral blood flow reference, diazepam, in P-gp saturation conditions. With its very unique brain transport properties, PKRinh improves our knowledge about P-gp-mediated efflux across the BBB for the development of new CNS directed drugs.

* Corresponding author at: Faculté de Pharmacie Paris Descartes, 4 Avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France.

E-mail addresses: camille.taccola@etu.parisdescartes.fr (C. Taccola), sylvaine.cartot-cotton@sanofi.com (S. Cartot-Cotton), delphine.valente@sanofi.com (D. Valente), pascal.barneoud@sanofi.com (P. Barneoud), catherine.aubert@sanofi.com (C. Aubert), valerie.boutet@sanofi.com (V. Boutet), fabienne.gallen@sanofi.com (F. Gallen), murielle.lochus@parisdescartes.fr (M. Lochus), sophie.nicolic@parisdescartes.fr (S. Nicolic), agnes.dodacki@etu.parisdescartes.fr (A. Dodacki), maria.smirnova@parisdescartes.fr (M. Smirnova), salvatore.cisternino@parisdescartes.fr (S. Cisternino), xavier.decleves@parisdescartes.fr (X. Declèves), fanchon.bourasset@parisdescartes.fr (F. Bourasset).

¹ 3 Digue d'Alfortville, 94140 Alfortville, France.

² 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

³ 5 Rue Thomas Mann, 75013 Paris, France.

⁴ 1 Avenue Pierre Brossolette, 91380 Chilly-Mazarin, France.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.02.005>

Received 17 October 2017; Received in revised form 21 December 2017; Accepted 5 February 2018

Available online 07 February 2018

0928-0987/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The double-stranded (ds) RNA-dependent protein kinase (PKR) belongs to a family of four serine-threonine protein kinases implicated in the activation of the α subunit of the eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) (Colthurst et al., 1987; Kaufman, 1999). PKR can be activated by viral dsRNA in virally infected cells or by the endogenous specific PKR protein activator (PACT in humans, or RAX in rodents), in response to diverse cellular stress signals in non-infected cells (Patel et al., 2000). In the brain, PKR activation results in eIF2 α phosphorylation, proapoptotic and toxic effects on neurons (Chang et al., 2002) which is why PKR is considered to be an upstream kinase in the stress-mediated apoptosis pathway (Peel and Bredesen, 2003; Ruvoletto, 2001). PKR and phosphorylated PKR (pPKR) levels were found to be increased in the cerebrospinal fluid (CSF) of Alzheimer's disease (AD) patients (Mouton-Liger et al., 2012b) and were correlated with the rate of cognitive decline in these patients (Dumurgier et al., 2013; Paquet et al., 2015). Moreover, a mouse model lacking PKR (Abraham et al., 1999) has shown enhanced learning abilities and long-term memory (LTM), increased network excitability and enhanced late long-term potentiation (L-TP) (Zhu et al., 2011). Finally, it has been shown that PKR mediates Tau phosphorylation in response to amyloid beta (A β) exposure (Bose et al., 2011) and increases the β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) mRNA translation (Ill-Raga et al., 2011; Mouton-Liger et al., 2012a; O'Connor et al., 2008). All together, these findings strongly suggest that PKR plays a significant role in neurodegenerative disorders (Chang et al., 2002). Thus, PKR inhibition becomes a promising approach to slow down neurodegeneration in several human diseases such as AD (Zhu et al., 2011). PKRinh, a new chemical entity that selectively inhibits PKR activation was recently developed by Sanofi (Mouton-Liger et al., 2015). PKRinh was previously shown to inhibit eIF2 α phosphorylation, reduce neuronal loss and neurodegeneration and decrease BACE1 synthesis leading to decreased A β production in thiamine-deficient (TD) mice, a mouse model of neurodegeneration (Mouton-Liger et al., 2015).

In order to reach their cerebral targets, drugs aimed at treating central nervous system (CNS) disorders must efficiently cross the blood-brain barrier (BBB) to reach the brain parenchyma. The BBB is composed of a monolayer of brain capillary endothelial cells (BCECs) and constitutes the main interface modulating exchanges of compounds between the brain and the blood. The tight junctions located between adjacent BCECs restrict diffusion of solutes via paracellular pathway. In addition, several transporters expressed in BCECs participate in the control of drug exchanges between brain and blood. These transporters belong either to the solute carriers (SLC) family, which regulates solutes cellular uptake and/or efflux (Abbott and Friedman, 2012) or to the ABC (ATP-binding cassette) transporters family. The latter is predominantly located at the luminal side of the BCECs, and acts as efflux transporters, thus restricting the brain entry of potentially toxic endogenous and exogenous compounds (Abbott et al., 2010; Abbott, 2013). P-glycoprotein (P-gp; ABCB1) and the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP; ABCG2) are the main ABC transporters that carry-out a vital neuroprotective and detoxifying function (Shawahna et al., 2011). Although SLC transporters have relatively tight substrate specificity, ABC transporters carry a broad spectrum of chemically unrelated compounds, leading to limited brain distribution of many xenobiotics (Abbott and Friedman, 2012). It has been shown that P-gp is responsible for the very poor brain penetration of large (> 400 Da) hydrophobic/amphiphilic drugs and that a number of drugs display a highly increased brain penetration in P-gp knockout mice (Schinkel, 1999).

For CNS drug candidates, such as PKRinh, it is of greatest importance to assess their ability to cross the BBB. But crossing the BBB is not *per se* sufficient; the compound also has to reside in the brain long enough to bind its target at efficient concentration to exert its pharmacological activity. This is why being a substrate for efflux proteins is

usually predictive for poor brain exposure and lack of therapeutic efficacy. In this study, we first used a conventional pharmacokinetic approach to explore PKRinh blood and brain distribution in wild-type (WT) mice. We then used the *in situ* brain perfusion technique to explore the mechanism(s) by which PKRinh crosses the BBB, and to determine if transporter(s) is(are) involved. We found that despite being a P-gp substrate at the mouse BBB, PKRinh shows greater brain uptake than regular P-gp substrates which might favor its CNS activity.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and chemicals

PKRinh physicochemical as well as absorption, distribution, metabolism and elimination (ADME) properties were determined previously (Sanofi internal data): molecular weight = 497 g/mol, cLogP = 5.1, solubility at pH 7.4 < 1 μ g/ml, blood to plasma ratio = 1.07, Caco-2 efflux ratio (measured at 20 μ M and pH 6.5) = 2.99, human hepatocyte intrinsic clearance (measured at 5 μ M) = 0.045 ml/h/10⁶ cells and contribution of human CYP3A to the hepatic clearance = 62%. Unbound fractions of PKRinh in plasma ($f_{u,plasma}$) and in brain homogenate ($f_{u,brain}$) were measured *in vitro* by equilibrium dialysis method: $f_{u,plasma}$ = 2.1 $\cdot 10^{-3}$, $f_{u,brain}$ = 2.1 $\cdot 10^{-4}$.

[¹⁴C]-sucrose (435.0 mCi/mmol) was purchased from Perkin Elmer, France. Irbesartan was purchased from Sanofi, France. PKRinh and PKRinh2 were manufactured by Sanofi, France. [³H]-PKRinh (25.2 Ci/mmol) was manufactured by Sanofi, Germany. PSC833 (valsopodar, used as P-gp inhibitor) was purchased from Sigma (St Quentin, France). Taurocholate, tetraethylammonium, digoxin and L-tryptophan were purchased from Sigma. Diphenhydramine was purchased from Inresa, France. All other chemicals were reagent grade commercial products.

2.2. Animals

C57BL/6 WT male mice were obtained from Charles River, France for the pharmacokinetics (PK) study. C57BL/6 WT male and female mice were obtained from Janvier, France for *in situ* brain perfusion. FVB WT and triple knockout (TKO) for P-gp and Bcrp (*Abcb1a*^{-/-}/*Abcb1b*^{-/-}/*Abcg2*^{-/-}) male and female mice were bred in house (Faculté de Pharmacie de Paris, France) from progenitors obtained from the laboratory of Dr. Alfred H. Schinkel (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands). All mice were housed in an environment maintained at 22 $\pm$ 2 °C with controlled humidity, a 12-hour light/12-hour dark cycle and access to food and tap water *ad libitum*. The acclimatization time before experimentation was at least 5 days. All experiments complied with the ethical rules of the European directive (2010/63/EU) for experimentation with laboratory animals. The PK study was performed in accordance with the standards of the ILAR (Institute for laboratory animal research) Guide (2010) and Sanofi Policy on Protection of Animals. The *in situ* brain perfusion experiments were approved by the ethics review committee of Paris Descartes University (study approval n° 12–181).

2.3. Pharmacokinetic study

PKRinh was prepared as a suspension of 1, 3 and 10 mg/ml in 0.6% methylcellulose/0.5% Tween 80, due to its poor solubility. The suspensions were prepared on the day of the experiment and kept under magnetic stirring during administration. PKRinh was administered as a single or repeated (once a day for 4 days) oral doses (gavage) of 10, 30 or 100 mg/kg, to 7–9 weeks old C57BL/6 WT male mice. Animals were individually weighed before dosing. Volumes to be administered were calculated on the basis of their body weight.

2.3.1. Blood sampling

Blood samples were collected either *via* retro-orbital bleeding using

50 µl heparinized capillary glass tubes or *via* cardiac puncture, at terminal time points, using non-heparinized syringes and immediately aliquoted into 50 µl heparinized capillary glass tubes. Both sampling procedures were realized under isoflurane anesthesia. Each mouse was maximally sampled twice for blood. Blood samples were collected at 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 8 and 24 h following last drug administration on Day 1 and on Day 4. The number of mice per time point was 6 to 12 for each dose level. Samples were stored at -80°C until bioanalytical analysis.

2.3.2. Brain sampling

The brain was collected at sacrifice, immediately after cardiac puncture, at 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 8 and 24 h following last drug administration on Day 1 and on Day 4. The number of mice per time point was 3 to 8 for each dose. Brains were dissected on ice to isolate the cortex from olfactory bulbs, cerebellum, thalamus, white matter and meninges. Cortices were put into 1.5 ml Precellys® CK14 tubes, weighted and frozen on carbo-isopentane. Samples were stored at -80°C until bioanalytical analysis.

2.4. Bioanalytical method

2.4.1. Sample preparation

Before analysis, blood and brain samples were thawed at room temperature. Brain samples were diluted at 1/5th with water and homogenized at 5000 rpm for 5 s using a Precellys®24 tissue homogenizer (Bertin Technologies) and the homogenate was then diluted at half with blank mouse plasma. PKRinh was extracted from blood and brain samples by protein precipitation followed by filtration on Ostro® pass-through sample preparation plates (Waters). The internal standard (IS) was PKRinh2 at 7.5 ng/ml in acetonitrile + 1% formic acid for blood samples and irbesartan at 1 ng/ml in acetonitrile + 1% formic acid for brain samples. Due to the irbesartan's signal instability in blood matrix, PKRinh2, a structural analog to PKRinh, was chosen as IS for blood analysis.

The calibration standards and quality control (QC) samples were prepared from a PKRinh stock solution in acetonitrile/water (50/50) diluted *via* a serial dilution with blank mouse blood or blank mouse plasma for blood and brain assay respectively. For the brain assay, blank mouse brain homogenate was added to the plasma standards and QC samples in order to match the study samples matrix. Standards and QC samples were prepared following the same precipitation-filtration protocol and on the same day than the study samples. Standard curve ranged from 1.00 ng/ml for the lower limit of quantification (LLOQ) to 2000 or 4000 ng/ml for the upper limit of quantification (ULOQ) for blood and brain assay respectively. QC samples at three concentrations levels; 3.00 ng/ml (low), 800 ng/ml (medium) and 1600 ng/ml (high) for blood assay and at four concentrations levels; 5.00 ng/ml (low), 50.0 and 800 ng/ml (medium), 3200 ng/ml (high) for brain assay, were analyzed in two replicates, one replicate at the beginning and one replicate at the end of each sample run. The accuracy of the bioanalytical method was determined on LLOQ samples and found to be 10.7%.

2.4.2. Instrumentation

A high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry system (HPLC-MS/MS) was used for the measurement of PKRinh concentrations in blood and brain samples. The HPLC system was comprised of a SIL20AC autosampler, two LC20AD pumps, a DGU-20A5 degassing unit and a CTO-AS_{vp} column oven (Shimadzu Scientific Instruments). The mass spectrometer consisted on an API 4000 triple quadrupole with a turbo spray source (Sciex Instruments) operating in multiple reaction-monitoring (MRM) and positive polarity mode for 4.5 min. The monitored transitions (*m/z*) were: 461.1 → 175.1 for PKRinh, 445 → 159 for PKRinh2 (IS for blood samples) and 429.3 → 207.3 for irbesartan (IS for brain samples). Due to the polarity and high lipophilicity of PKRinh, a reversed-phase chromatography was performed using a Xbridge C18 column (50 × 2.1 mm, with a particle

size of 5 µm (Waters)) heated at 40 °C. The mobile phase consisted on a solvent A (water + 0.1% formic acid) and a solvent B (acetonitrile + 0.1% formic acid). PKRinh and IS were eluted using a gradient elution program of 20 to 80% B in 3.5 min, a 0.5 min hold at 80% B, followed by a return to 20% B for a 1 min equilibration. The flow rate was 0.6 ml/min. A 10 µl aliquot of the prepared sample was injected onto the HPLC column. The retention time was 2.05 min for PKRinh, 1.62 min for PKRinh2 and 2.03 min for irbesartan. Analyst 1.6.2 software was used for data acquisition and analysis.

2.5. In situ brain perfusion

Surgical procedure and perfusion technique: The transport of [³H]-PKRinh into the brain of mice was measured using the *in situ* brain perfusion method. This method allows a complete substitution of the brain vasculature by an artificial perfusion fluid whose composition, flow rate and perfusion time are fully controlled. Several BBB drug transport parameters, such as the brain volume of distribution (*V_d*) and the brain uptake clearance (*Cl_{up}* or *K_{in}*), can thus be measured (Cattelotte et al., 2008; Dagenais et al., 2000; Takasato et al., 1984). Briefly, the mice were weighted and anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine-xylazine mixture (140 and 8 mg/kg respectively). The right common carotid artery was ligated on the heart side and the right external carotid artery was ligated at the level of its bifurcation from the common artery. The right common carotid was then catheterized with heparin-filled polyethylene tubing (0.3 mm i.d. × 0.7 mm o.d.). The syringe containing the perfusion fluid was placed in an infusion pump (Harvard pump PHD 2000, Harvard Apparatus, France) and connected to the catheter. Just before perfusion, the thorax of the animal was opened and the heart was cut to ensure that the entire brain blood is replaced by the perfusion fluid. Perfusion was started immediately at a flow rate of 2.5 ml/min. Each mouse was perfused with [³H]-PKRinh (0.3 µCi/ml) and [¹⁴C]-sucrose (0.1 µCi/ml) as a vascular marker for 30 s–2 min. The P-gp inhibitor (PSC833, 5 µM) as well as the influx transporter's inhibitors (taurocholate 1 mM, digoxin 50 µM, tetraethylammonium 10 mM, diphenhydramine 10 mM or L-tryptophan 5 mM) was added to the perfusion fluid when necessary. The perfusion was terminated by decapitating the animal. The brain was removed from the skull and dissected on ice. The right brain hemisphere as well as aliquots of the perfusion fluid were placed in tared glass vials and weighted. Brain samples were digested in 2 ml of solubilizer (Solvable®, PerkinElmer) for about 24 h. Brain and perfusion fluid samples were mixed with 9 ml of Ultima Gold XR® scintillation cocktail (PerkinElmer). For all samples, ³H and ¹⁴C isotopes were counted simultaneously in a liquid scintillation counter (Tri-Carb® 2810 TR, PerkinElmer).

Perfusion fluid: The perfusion fluid consisted of Krebs bicarbonate-buffered physiological saline (in mM: 128 NaCl, 24 NaHCO₃, 4.2 KCl, 2.4 NaH₂PO₄, 1.5 CaCl₂, 0.9 MgSO₄ and 9 D-glucose) warmed at 37 °C and gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ to obtain a pH of 7.4. [³H]-PKRinh, [¹⁴C]-sucrose ± PKRinh (from 10 nM to 15 µM) and PSC833 (5 µM) were added to the perfusate at the appropriate concentration depending on the experiment. Ethanol and/or DMSO did not exceed 0.5% of the perfusate.

Calculation of BBB transport parameters: Calculations were done as previously described (Cattelotte et al., 2008; Dagenais et al., 2000; Smith, 1996; Takasato et al., 1984). The brain vascular volume (*V_{vasc}*, µl/g) was estimated from the volume of tissue distribution of [¹⁴C]-sucrose, which is known for not crossing the BBB during short perfusion time. *V_{vasc}* was calculated as follows:

$$V_{\text{vasc}} = \frac{Q_{\text{sucrose}}}{C_{\text{sucrose}}} \quad (1)$$

where *Q_{sucrose}* (dpm/g) is the amount of [¹⁴C]-sucrose in the right brain hemisphere and *C_{sucrose}* (dpm/µl) is the [¹⁴C]-sucrose concentration in the perfusion fluid. Before further calculations, it was ensured that all

mice had a V_{vasc} within the normal range (i.e. $V_{\text{vasc}} < 20 \mu\text{l/g}$) (Cattelotte et al., 2008), indicating that the BBB was not altered during the experiment. The apparent brain tissue distribution volume (V_d , $\mu\text{l/g}$) of [^3H]-PKRinh was calculated as follows:

$$V_d = \frac{Q}{C_{\text{perf}}} \quad (2)$$

where Q (dpm/g) is the amount of [^3H]-PKRinh in the right brain parenchyma and C_{perf} (dpm/ μl) is the [^3H]-PKRinh concentration in the perfusion fluid. In order to account for vascular contamination of the brain hemisphere, Q was previously corrected by subtracting the [^3H]-PKRinh remaining in the vascular space from the total [^3H]-PKRinh in the tissue sample (Q_{tot} , dpm/g):

$$Q = Q_{\text{tot}} - V_{\text{vasc}} \times C_{\text{perf}} \quad (3)$$

The brain coefficient transport (K_{in} , $\mu\text{l/g/s}$), also called the brain uptake clearance (Cl_{up} , $\mu\text{l/g/s}$), was calculated as follows:

$$K_{\text{in}} = \frac{V_d}{T} \quad (4)$$

where T is the perfusion time in seconds. This K_{in} parameter enabled us to identify and characterize the different influx or efflux transporters involved in the transport of PKRinh at the luminal side of the BBB. The BBB transport parameters were estimated by plotting the drug uptake clearance (K_{in} ; $\mu\text{l/g/s}$) against total concentrations in perfusion fluid using a sigmoid E_{max} model:

$$E = E_0 + \frac{E_{\text{max}} \times C_{\text{tot}}^\gamma}{IC_{50}^\gamma + C_{\text{tot}}^\gamma} \quad (5)$$

where C_{tot} is the total PKRinh concentration (unlabeled and radiolabeled PKRinh) in the perfusion fluid (μM), E represents the brain coefficient transport (K_{in} , $\mu\text{l/g/s}$) of [^3H]-PKRinh, E_0 is the minimal brain coefficient transport ($K_{\text{in}_{\text{min}}}$, $\mu\text{l/g/s}$) of [^3H]-PKRinh, E_{max} is the difference between the maximal and minimal brain coefficient transport ($K_{\text{in}_{\text{max}}} - K_{\text{in}_{\text{min}}}$) of [^3H]-PKRinh ($\mu\text{l/g/s}$), IC_{50} is the concentration at which brain transport was half-maximally inhibited (μM) and γ is the Hill coefficient.

The permeability-surface area product (PS, $\mu\text{l/g/s}$) was calculated from K_{in} using the Crone-Renkin equation (CRE):

$$PS = -F \times \ln(1 - K_{\text{in}}/F) \quad (6)$$

where F represents the cerebral perfusate flow ($\mu\text{l/g/s}$). Because of the structure of the CRE, the results tend to be more variable when the K_{in} are close to F . The CRE implies that the upper limit of a compound's K_{in} is the cerebral blood flow, that is, the K_{in} of diazepam which has been previously estimated from $42.3 \mu\text{l/g/s}$ to $52 \mu\text{l/g/s}$, depending on the studies (Alata et al., 2015; Cattelotte et al., 2008). However, Summerfield et al. have reported that 17 compounds had greater K_{in} than the one of diazepam in rats. In particular sertraline ($\text{cLogP} = 4.8$, $f_{\text{u,brain}} = 9 \cdot 10^{-4}$), an antidepressant of the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) class, exhibit a K_{in} of $73.2 \mu\text{l/g/s}$ (Summerfield et al., 2007). One hypothesis could be that a high brain tissue binding, i.e. low $f_{\text{u,brain}}$, may be acting as a drug sink, facilitating the brain penetration of lipophilic drugs ($\text{cLogP} > 4$). Thus, in this study, diazepam could not be used as the flow marker for calculation of PS values via the CRE; the flow component F was taken as the highest K_{in} measured (sertraline). Similarly, Avdeef et al. have shown that the traditional CRE using diazepam as flow marker fails to determine reliable PS values for lipophilic drugs (Avdeef and Sun, 2011). Finally, Dagenais et al. have showed that amitriptyline, buspirone and chlorpromazine ($\text{LogP} = 4.9$, 2.7 and 5.4 respectively) have greater K_{in} than diazepam in WT mice ($K_{\text{in}} = 55.8$, 54.2 and $50 \mu\text{l/g/s}$ respectively) (Dagenais et al., 2009). They chose to set $F = 71.6 \mu\text{l/g/s}$ to allow conversion of all of the measured K_{in} to PS values (Dagenais et al., 2009). Since PKRinh had a high cLogP (5.1) and very low $f_{\text{u,brain}}$ ($2.1 \cdot 10^{-4}$), and in order to be consistent with previous published data on mouse *in situ* brain perfusion

of lipophilic drugs, we decided to set $F = 71.6 \mu\text{l/g/s}$ for PS calculations.

The rate of drug uptake or “brain flux” (J_{net} , $\mu\text{mol/g/s}$) was calculated as follows:

$$J_{\text{net}} = PS \times C_{\text{tot}} \quad (7)$$

In case of a saturable transport, the brain flux takes the form of a Michaelis-Menten equation which includes a non-saturable component (passive transport) and a saturable component (active transport; influx or efflux):

$$J_{\text{net}} = K_{\text{passive}} \times C_{\text{tot}} \pm \frac{V_{\text{max}} \times C_{\text{tot}}}{K_m + C_{\text{tot}}} \quad (8)$$

where J_{net} is the net flux across the BBB ($\mu\text{mol/g/s}$), V_{max} is the maximal velocity of transport ($\mu\text{mol/g/s}$), K_m is the apparent Michaelis-Menten transport parameter ($\mu\text{mol}/\mu\text{l}$) which represents the concentration at the half-maximal carrier velocity, and K_{passive} is the unsaturable flux component ($\mu\text{l/g/s}$) with C_{tot} being expressed in $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$. The data were then fitted using nonlinear regression analysis.

2.6. Data analysis

The blood and brain PK parameters (maximum concentration (C_{max}), time to reach maximum concentration (T_{max}), terminal half-life ($t_{1/2}$) and the area under the concentration time curve between 0 and 24 h (AUC_{τ}) were estimated from mean concentrations at each time by non-compartmental analysis using Phoenix WinNonlin® 6.4 software (Pharsight). The $t_{1/2}$ and AUCs were calculated using a linear trapezoidal linear interpolation method; C_{max} and T_{max} were observed values. The brain to plasma AUC ratios of unbound drug ($K_{\text{p,u,brain}}$) were calculated as follow:

$$K_{\text{p,u,brain}} = \frac{\text{AUC}_{\tau,\text{brain}} \times f_{\text{u,brain}}}{\text{AUC}_{\tau,\text{plasma}} \times f_{\text{u,plasma}}} \quad (9)$$

The $\text{AUC}_{\tau,\text{blood}}$ were converted into $\text{AUC}_{\tau,\text{plasma}}$ using the blood to plasma ratio of PKRinh.

The dose ranging effect on blood and brain PK parameters was determined by plotting blood and brain C_{max} or AUC_{τ} against dose and performing a linear regression. Statistical difference with theoretical dose-proportionality was estimated on slopes values.

In situ brain perfusion results (V_d and K_{in}) are presented either as individual data or mean $\pm$ standard deviation (SD). The BBB transport parameters (E_{max} , IC_{50} , γ and E_0) were estimated by fitting equation (5) using Phoenix WinNonlin® 6.4 software. Results are expressed as estimated data $\pm$ SD.

The passive and active transport parameters of PKRinh (V_m , K_m and K_{passive}) were estimated by plotting brain flux (J_{net} , $\mu\text{mol/s/g}$) against total concentration using the carrier-mediated Michaelis-Menten equation (Eq. 8) and performing a nonlinear regression with the Phoenix WinNonlin® software. Results are expressed as estimated data $\pm$ SD. The errors associated with the kinetic parameters are asymptotic standard errors returned by a nonlinear regression routine and are a measure of the certainty of the best-fit value.

The PKRinh efflux ratios (ER) were calculated as the ratio of K_{in} measured with or without P-gp inhibitor ($\text{ER}^{\text{PSC833/Ctrl}}$), or in TKO vs. WT mice ($\text{ER}^{\text{TKO/WT}}$) or with saturating vs. non-saturating perfusate concentration ($\text{ER}^{\text{saturating C/non saturating C}}$).

2.7. Statistical analysis

When applicable, a *t*-test or a one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-test was used to identify significant differences. Analyses were performed on GraphPad Prism software and statistical significance was set at $p < 0.05$.

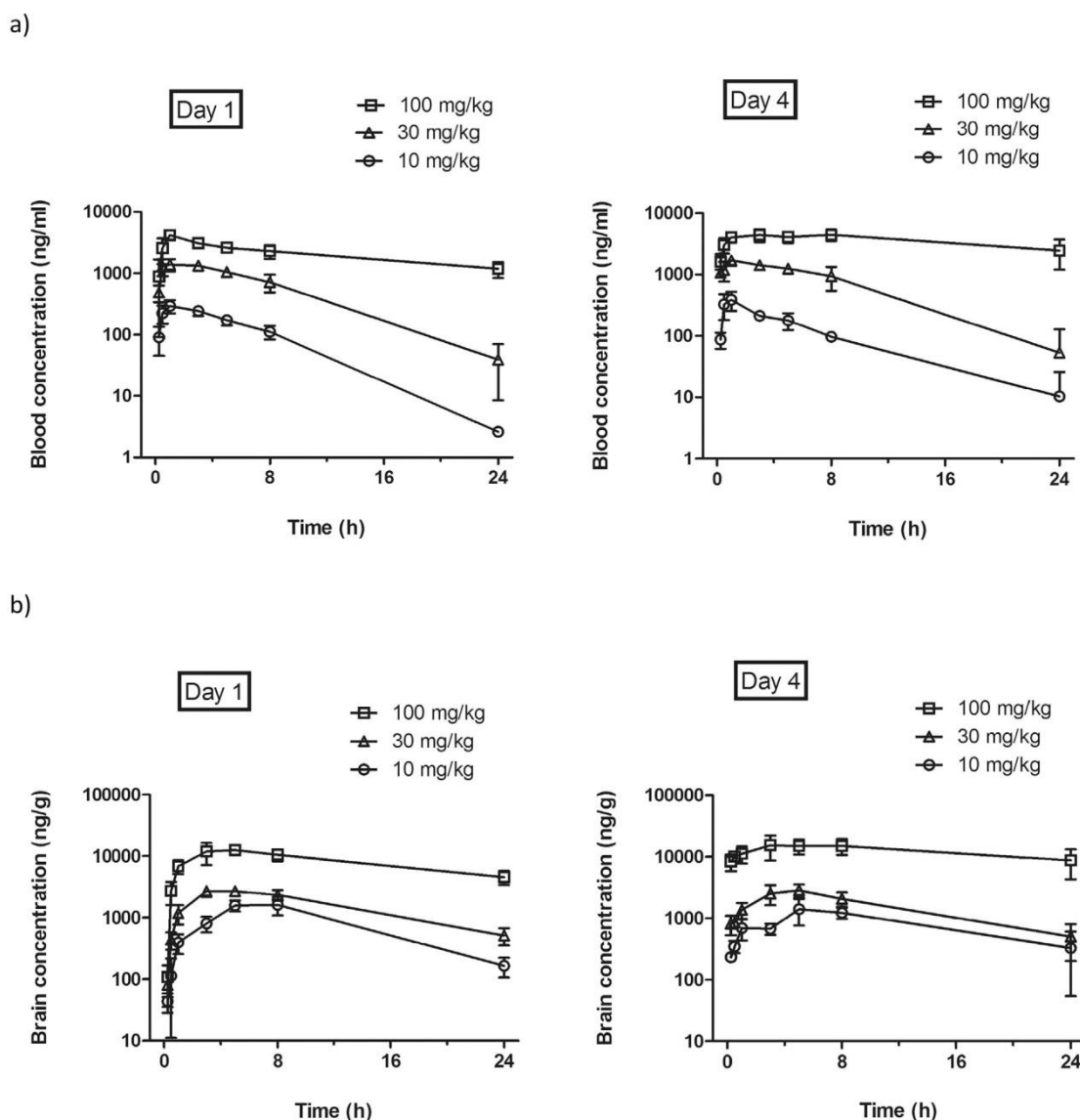


Fig. 1. Time course of PKRinh blood and brain concentrations.

Mean blood (a) and brain (b) concentration versus time profiles of PKRinh after single (Day 1) and repeated (Day 4, $\tau = 24$ h) oral administrations of 10 ($\circ$), 30 (Δ) and 100 ($\square$) mg/kg in C57BL/6 WT mice. Units are in ng/ml for blood and ng/g for brain. Data represent the mean $\pm$ SD of $N = 6$ to 12 (blood) and $N = 3$ to 8 (brain) mice for each time point on a semi-log scale.

3. Results

3.1. Blood and brain pharmacokinetics

Time course of mean total blood and brain concentrations of PKRinh after single (Day 1) and repeated (Day 4, $\tau = 24$ h) oral administration at 10, 30 and 100 mg/kg in C56BL/6 WT mice are shown in Fig. 1a) and b) for blood and brain, respectively. The blood and brain PK parameters (C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$, AUC_{τ} and $K_{p,u,b,brain}$) were estimated by a non-compartmental analysis as described in materials and methods, and are shown in Table 1.

On Day 1, blood concentrations peaked rapidly with C_{max} reached 1 h after dosing for all doses. Maximal PKRinh concentrations were reached between 3 and 8 h after dosing, depending on the dose administered. The sampling period was too short to capture the complete

elimination of PKRinh for the highest dose in blood, and for all doses in brain. However, $t_{1/2}$ could be determined in blood at 10 and 30 mg/kg and were found to be 3.1 and 4.0 h, respectively. These data are in good agreement with previous studies conducted in mice for this compound and for which $t_{1/2}$ were found to be 3.9, 4.0 and 5.0 h at 10, 30 and 100 mg/kg respectively (internal data, not shown). Therefore, the steady state is predicted to be reached before the Day 4 of our study.

On day 4, blood concentrations also peaked rapidly with C_{max} reached 1 h after dosing at 10 and 30 mg/kg, but there was a plateau between 1 and 8 h at 100 mg/kg, leading to a C_{max} at 8 h for this higher dose. Maximal PKRinh concentrations were reached 5 h after dosing at 10 and 30 mg/kg. Because of the blood concentrations plateau at 100 mg/kg, the brain C_{max} was found to be earlier than the blood C_{max} at this higher dose. The observed accumulation ratios after 4 days of repeated administrations of PKRinh were found to be close to 1 in blood

Table 1
PKRinh blood and brain PK parameters.

	Dose (mg/kg)	Day 1				Day 4			Observed accumulation ratio (AUC _{τ,Day4} /AUC _{τ,Day1})
		C _{max} (ng/ml or ng/g)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _τ (ng·h/ml or ng·h/g)	C _{max} (ng/ml or ng/g)	T _{max} (h)	AUC _τ (ng·h/ml or ng·h/g)	
Blood	10	292	1	3.1	2467	390	1	2522	1.02
	30	1388	1	4.0	14,785	1711	1	18,139	1.23
	100	4187	1	NA*	50,384	4491	8	88,246	1.75
Brain	10	1620	8		22,828	1420	5	20,367	0.89
	30	2718	3		40,386	2850	5	38,330	0.95
	100	12,550	5		201,229	15,383	3	301,456	1.50
K _{p_{u,u},brain}	10							0.86	
	30							0.23	
	100							0.37	

NA = not applicable.

* t_{1/2} could not be calculated with good precision for this dose.

and brain at 10 and 30 mg/kg. However, there was an accumulation over the 4 days treatment period at the highest dose tested, and this accumulation was more extensive in blood than in brain (observed accumulation ratio = 1.75 and 1.5 in blood and in brain, respectively), which is in good agreement with the blood concentrations plateau observed on Day 4 at 100 mg/kg.

The brain to blood AUC ratios of unbound drug (K_{p_{u,u},brain}) were found to be lower than 1 at all doses, suggesting an active efflux phenomenon at the BBB. In accordance with Giudicelli and colleagues who showed that no correction for residual blood in brain concentrations was needed for drugs which total brain/blood concentration ratios are > 0.1 (Giudicelli et al., 2004), we did not correct the total brain concentrations from the intravascular contamination.

The steady state being reached on Day 4, we decided to focus on the Day 4 data in order to explore the relative increase of AUC_τ with dose.

3.2. Dose ranging effect on blood and brain pharmacokinetics

The relationship between doses and PKRinh AUC_τ measured at steady state (Day 4), are shown in Fig. 2a) and b) for blood and brain, respectively. PKRinh blood AUC_τ increased clearly in a supra dose-proportional way. Indeed, the blood AUC_τ ratio on Day 4 between 10 and 100 mg/kg is 35 for a dose ratio of 10 (Table 1). It was not so clear for the brain. Indeed, the brain AUC_τ ratio on Day 4 between 10 and 100 mg/kg is 15 for a dose ratio of 10 (Table 1). However, the slopes of brain AUC_τ linear regression versus dose and theoretical dose-proportionality were not significantly different ($p = 0.077$), showing that PKRinh brain AUC_τ increased dose-proportionally. It is noteworthy that the decrease in K_{p_{u,u},brain} observed with dose is probably due to the supra dose-proportionality of PKRinh blood PK.

Altogether these data suggest that the PKRinh blood PK is supra dose-proportional, whereas the brain PK is dose-proportional. It can be hypothesized that the blood supra dose-proportionality comes either from a non-dose-proportional tissue distribution (others than brain), or more likely from a saturation of an elimination process, but the elimination mechanism of the molecule is not known yet.

3.3. Physical integrity of the BBB during transport studies

The V_{vasc} was measured in each mouse used in our *in situ* brain perfusion studies, using [¹⁴C]-sucrose (Supplementary data, Fig. S1). All the values were in the normal range (i.e. V_{vasc} < 20 μl/g) (Cattelotte et al., 2008; Takasato et al., 1984). The integrity of the vascular compartment was thus unaltered by the increasing concentrations of PKRinh in the perfusion fluid. These data suggest that PKRinh (up to 15 μM) had no acute effect on the physical integrity of the BBB during perfusion.

3.4. Effect of perfusion time on brain transport

We first measured the time-course of the brain volume of distribution (V_d, μl/g) of [³H]-PKRinh in C57BL/6 WT mice (Fig. 3). We observed a linear increase of [³H]-PKRinh V_d as a function of the perfusion time between 30 and 120 s ($r^2 = 0.9975$), suggesting that [³H]-PKRinh transport rate remained unchanged over time. The perfusion time must be chosen within the linear part of the distribution kinetics, ensuring that the luminal membrane of the BBB is the only interface that affects the distribution of the compound and that passive back flux is insignificant (Cattelotte et al., 2008). The perfusion time must also be as short as possible to ensure that the BBB keeps its physiological properties during the whole experiment. We selected a perfusion time of 60 s for subsequent single time-points experiments.

3.5. Effect of PKRinh concentration on its brain transport

PKRinh brain transport, expressed as K_{in}, was measured with increasing concentrations of PKRinh in the perfusate, up to the highest concentration achievable in an aqueous solution (from 10 nM to 15 μM). The concentration-dependent brain transport of PKRinh is shown in Fig. 4. The mean brain uptake of PKRinh observed at the lowest dose (10 nM) was 13.8 ± 3.1 μl/g/s. PKRinh brain uptake then increased rapidly with perfusate concentration and finally reached a plateau at 4 μM with a K_{in} of 58.0 ± 5.0 μl/g/s at the highest dose (15 μM). These results suggest that an active protein-mediated efflux is involved in PKRinh transport through the BBB and that this mechanism becomes eventually saturated with increasing perfusate PKRinh concentrations. The variation in PKRinh K_{in} with total perfusate concentrations fitted a sigmoid E_{max} equation with a Hill coefficient of 3.04 ± 0.93 and an IC₅₀ value of 0.89 ± 0.08 μM. The minimum K_{in} value (E₀), estimated for lowest PKRinh concentrations, was 13.7 ± 1.49 μl/g/s and the maximum additive net K_{in} value (E_{max}), estimated for highest PKRinh concentrations, was 39.8 ± 2.21 μl/g/s. The concentration-dependent brain transport of [³H]-PKRinh can thus be described as the following sigmoid E_{max} equation:

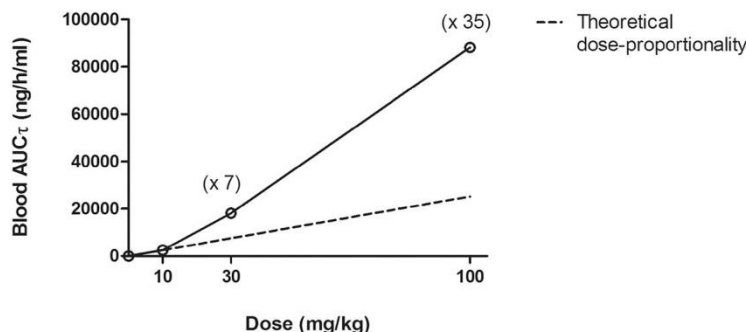
$$K_{in} = 13.7 + \frac{39.8 \times C_{tot}^{3.04}}{0.89^{3.04} + C_{tot}^{3.04}}$$

with K_{in} in μl/g/s and C_{tot} in μM. The efflux ratio (ER) between saturating and non-saturating concentration was found to be 3.9.

3.6. Passive and carrier-mediated transport components at the BBB

In order to investigate the involvement of a protein-mediated efflux of PKRinh at the BBB, the total PKRinh brain flux, expressed as the rate of brain uptake, J_{net}, was fitted to total perfusate concentrations (C_{tot}) (Fig. 5, solid line). J_{net} was calculated for each sample using the Crone-

a)



b)

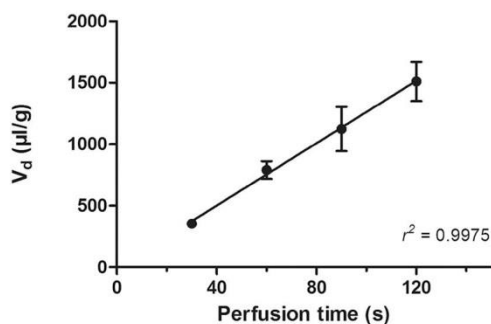
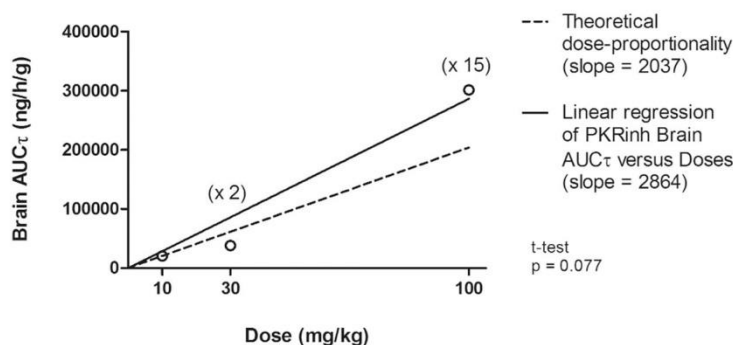


Fig. 3. Time course of PKRinh apparent brain distribution volume. The apparent brain distribution volume, V_d ($\mu\text{l/g}$) of [^3H]-PKRinh in C57BL/6 WT mouse was determined by *in situ* brain perfusion for 30, 60, 90 and 120 s. The line indicates a linear regression ($y = 12.68x$) with $r^2 = 0.9975$. Data represent the means $\pm$ SD for 5 animals per time point.

Renkin equation (Eq. 7). This equation fitted the observed data very well. The total brain flux increases slowly at low perfusate concentrations and follows a linear increase after a certain perfusate concentrations. This shape of the J_{net} is typical of an active saturable process mixed with a passive unsaturable flux. If a compound is supported by an efflux transporter, the total brain flux versus perfusate concentration can be modelled by an equation involving both a passive unsaturable component and an active saturable component (= Michaelis-Menten term) (Eq. 8). Performing the nonlinear regression of the data with this equation gave the following parameters estimates: K_{passive} (rate of the passive unsaturable flux) = $148.5 \pm 22.7 \mu\text{l/g/s}$, V_{max} (maximum velocity of the efflux) = $0.40 \cdot 10^{-3} \pm 0.22 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/g/s}$ and K_m (concentration at the half of the maximal transport velocity) = 3.04

Fig. 2. PKRinh areas under the curves dose proportionality.

Relationship between doses and the areas under the curves (AUC_τ) measured at steady state (on Day 4), in the blood (a) and brain (b) of C57BL/6 WT mice after repeated ($\tau = 24$ h) oral administrations of PKRinh at 10, 30 and 100 mg/kg. Values in parentheses represent the increase of the AUC_τ at 30 and 100 mg/kg compared to 10 mg/kg, corresponding to a dose ratio of 3 and 10 respectively. Theoretical dose-proportionality is shown as a dotted line. Blood AUC_τ increase clearly in a supra dose-proportional way with dose. In brain, the slope of AUC_τ linear regression versus dose was compared with theoretical dose-proportionality. A t-test was used to identify significant differences (statistical significance was set at $p < 0.05$). The slopes were not significantly different ($p = 0.077$), showing that brain AUC_τ increases in a dose-proportional way with dose.

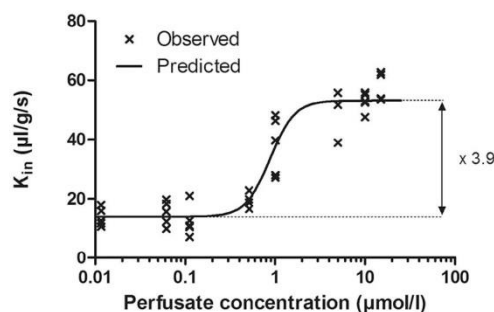


Fig. 4. PKRinh concentration-dependent brain transport.

Observed [^3H]-PKRinh brain transport coefficients (K_{in} , $\mu\text{l/g/s}$), following *in situ* brain perfusion in C57BL/6 WT mice, were fitted to total concentrations in perfusion fluid (C_{tot} , μM) using a Sigmoid E_{max} Model (Phoenix WinNonlin® software). The estimated parameters are: $E_{\text{max}} = 39.8 \pm 2.21 \mu\text{l/g/s}$, $\text{IC}_{50} = 0.89 \pm 0.08 \mu\text{M}$, $E_0 = 13.7 \pm 1.49 \mu\text{l/g/s}$ and $\text{Gamma} = 3.04 \pm 0.93$. The ratio between the K_{in} min (E_0) and K_{in} max ($E_0 + E_{\text{max}}$) is 3.9.

$10^{-6} \pm 1.23 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}/\mu\text{l}$. Using K_{passive} , we could draw the passive unsaturable component (Fig. 5, dotted line) of PKRinh flux which corresponds to the passive free diffusion of PKRinh through the BBB. Finally, the active saturable flux of PKRinh (Fig. 5, dashed line) was drawn by subtracting the passive unsaturated flux from the total flux and corresponds to the carrier-mediated efflux of PKRinh. The total flux of [^3H]-PKRinh across the BBB can thus be described as the following equation:

$$J_{\text{net}} = 148.5 \times C_{\text{tot}} - \frac{0.40 \cdot 10^{-3} \times C_{\text{tot}}}{3.04 \cdot 10^{-6} + C_{\text{tot}}}$$

with J_{net} in $\mu\text{mol/g/s}$ and C_{tot} in $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$.

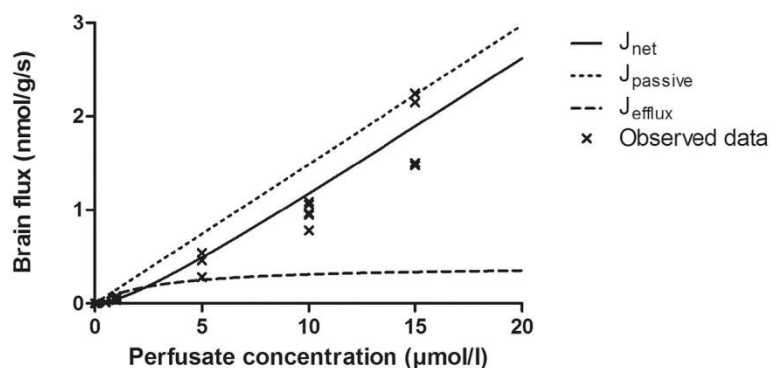


Fig. 5. Passive and carrier-mediated fluxes at the blood brain barrier. Total [^{3} H]-PKRinh flux (J_{net} , nmol/g/s; solid line) was measured in the mouse right hemisphere and fitted to total concentration in Krebs-carbonate perfusion fluid (C_{tot} , μM). The dotted line represents the passive diffusion of PKRinh through the BBB. The dashed line represents the curve obtained by subtracting the passive flux from the total flux and fitted to the carrier-mediated Michaelis-Menten equation by non-linear least squares regression. The estimated parameters for PKRinh BBB transport are: $K_{\text{passive}} = 148.5 \pm 22.7 \mu\text{l/g/s}$, $K_m = 3.04 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 0.40 \times 10^{-3} \pm 0.22 \times 10^{-3} \mu\text{mol/g/s}$.

3.7. Identification of PKRinh efflux transporter

In order to identify which transporter(s) is(are) implicated in the saturable efflux of PKRinh at the BBB, we perfused PKRinh at a non-saturating dose (10 nM) in FVB WT mice with and without PSC833, a known P-gp inhibitor (Achira et al., 1999; Boesch et al., 1991) and in FVB P-gp/Bcrp-deficient (= FVB TKO) mice. PSC833 was used at 5 μM , a concentration that was shown to inhibit the entire P-gp function at the mouse BBB (Cisternino et al., 2004). FVB TKO mice are mutant mice lacking *Abcb1a*, *Abcb1b* (mouse P-gp genes) and *Abcg2* (mouse Bcrp gene), two of the main ABC transporters found at the BBB (Löschner and Potschka, 2005), on FVB background (Wijnholds et al., 2000). Results are shown on Fig. 6. We showed that the K_{in} of PKRinh in FVB WT mice ($14.2 \pm 6.1 \mu\text{l/g/s}$) was significantly different ($p < 0.001$) than both K_{in} of PKRinh in FVB WT mice co-perfused with PSC833 and in FVB TKO mice (51.6 ± 4.4 and $50.8 \pm 6.9 \mu\text{l/g/s}$ respectively). It is noteworthy that K_{in} obtained in FVB WT mice co-perfused with PSC833 and in FVB TKO mice are not significantly different. Similarly, K_{in} obtained in FVB TKO mice co-perfused or not with PSC833 are not significantly different. The K_{in} of PKRinh in FVB TKO mice is similar to the K_{in} obtained in C57BL/6 WT mice at a saturating concentration (15 μM , Fig. 4) (14.2 and $13.7 \mu\text{l/g/s}$ respectively), suggesting no impact of the mouse strain on PKRinh brain uptake. Moreover, in C57BL/6 WT mice, the efflux ratio between saturating and non-saturating doses was 3.9 (Fig. 4), similarly to the efflux ratio of 3.6 between FVB TKO and WT mice (Fig. 6). Taken together, these results suggest that PKRinh is specifically effluxed by P-gp at the BBB.

3.8. Involvement of influx transporters in PKRinh brain uptake

In order to investigate if a potential carrier-mediated influx was involved in the PKRinh brain uptake, we perfused PKRinh with

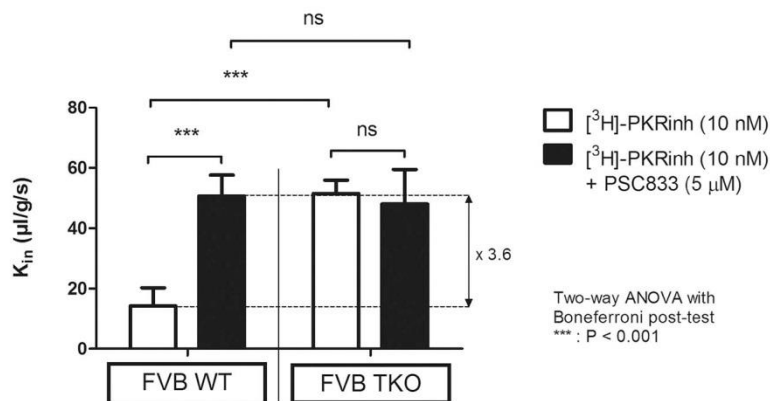


Fig. 6. P-gp mediated efflux at the blood brain barrier.

The brain transport coefficient (K_{in} , $\mu\text{l/g/s}$) of [^{3} H]-PKRinh was measured by *in situ* brain perfusion in FVB WT and P-gp/Bcrp-deficient mice (= FVB TKO) with and without the P-gp inhibitor (PSC833, 5 μM). Each group of animals was perfused with [^{3} H]-PKRinh at a non-inhibiting concentration (10 nM) for 60 s. Data represent the means $\pm$ SD for 5–6 animals per group. A two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test was used to identify significant differences. P-gp deficiency produced a 3.6-fold increase in the brain transport of PKRinh ($p < 0.001$). P-gp inhibition by PSC833 produced a 3.6 fold increase in the brain transport of PKRinh in FVB WT mice ($p < 0.001$).

4. Discussion

Drug delivery to the brain parenchyma represents a major obstacle

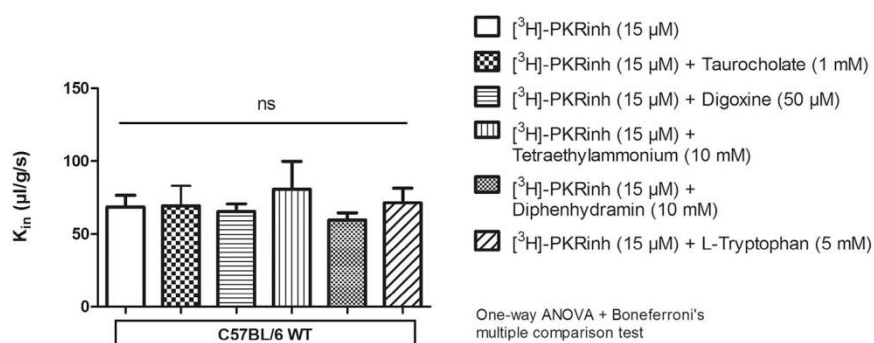


Fig. 7. Absence of active influx at the blood brain barrier.

The brain transport coefficient (K_{in} , $\mu\text{l/g/s}$) of [^3H]-PKRinh was measured by *in situ* brain perfusion in C57BL/6 WT, with or without influx transporters inhibitors: taurocholate (Oatp1a4, OAT3 and Oatp14 inhibitor), digoxin (Oatp1a4 inhibitor), tetraethylammonium (OCT1 and OCT2 inhibitor), diphenhydramine (H^+ -antiporter inhibitor, OCT1 and OCT2 inhibitor), L-tryptophan (LAT1 inhibitor). WT mice were perfused with [^3H]-PKRinh at a P-gp inhibiting concentration (15 μM) for 60 s. $N = 4$ –5 animals per group. A one-way ANOVA followed by a Bonferroni's multiple comparison test was used to identify significant differences.

to CNS drugs development since 98% of the new candidates do not cross the BBB efficiently (Terasaki and Pardridge, 2000). PKRinh is a new CNS drug candidate for which we combined both, conventional PK approach and *in situ* brain perfusion technique to study the blood and brain PK and transport across the BBB. Our data show that $K_{p_{u,u}}$ of PKRinh is smaller than 1 at all doses, meaning the absence of equilibrium between the unbound fraction of plasma (plasma_u) and brain extracellular fluid (bECF) which represents the unbound fraction of the brain (Brain_u). Hence, a small $K_{p_{u,u}}$ value can be interpreted as a restriction of the BBB drug uptake, due to the involvement of an efflux transporter (Hammarlund-Udenaes et al., 1997; Tunblad et al., 2003; Xie et al., 2000). However, the pharmacological effect of a CNS drug such as PKRinh is not only dependent on its Brain_u but also on its bound brain fraction (Brain_b), which includes both, its brain intracellular fluid (bICF) distribution and drug binding to unspecific and specific brain targets. This bound/unbound partition is of a great importance since a high Brain_b fraction resulted in a small Brain_u fraction and thus in a small $K_{p_{u,u}}$, independently of the BBB transport mechanism, i.e. even if there is no restriction of the drug brain uptake at the BBB level. In this case, the equilibrium between total brain (i.e. bound and unbound) and plasma_u concentrations can be achieved, as we previously showed for an AMPA modulator known as S18986, which is a lipophilic drug having a high K_{in} (at around 20 $\mu\text{l/g/s}$) and a small $K_{p_{u,u}}$ ($=0.3$). Our data evidenced that S18986 was not effluxed at the BBB level and that its small $K_{p_{u,u}}$ was due to its high Brain_b with a ratio $\text{Brain}_b/\text{plasma}_u$ equal to 1 and a $\text{Brain}_b/\text{Brain}_u$ ratio equal to 4.5 (Bourasset et al., 2005). PKRinh is a compound having a very small unbound brain fraction ($2.1 \cdot 10^{-4}$), so the bound fraction is equal to 0.99 and the $\text{Brain}_b/\text{Brain}_u$ ratio is at around 4700. These data show that, despite a small $K_{p_{u,u}}$, the total brain exposure of PKRinh is high enough to allow a significant pharmacological effect which was observed in mice receiving 30 mg/kg/24 h of PKRinh by oral gavage (Mouton-Liger et al., 2015). Thus, the $K_{p_{u,u}}$ of PKRinh smaller than one might be due to its high Brain_b . However, it could also result from the involvement of an efflux transporter at the BBB level. We tested this hypothesis by using the *in situ* brain perfusion technique. Our results support this hypothesis since we evidenced a saturation of the PKRinh brain uptake with increasing PKRinh concentration, independently of any loss of the BBB integrity. We thus determined the passive and active components of the PKRinh flux through the BBB and found a K_m at around 3 μM , which is in the same range than K_m of many P-gp substrates (Lin and Yamazaki, 2003; Makhey et al., 1998). Indeed, the K_m of cyclosporine A, digoxin and verapamil were determined, *in vitro*, at 3.8 μM , 58 μM and 4.4–31 μM , respectively (Fricker et al., 1996; Makhey et al., 1998; Stephens et al., 2001). Similarly, the K_m values of vinblastine and cabazitaxel (TXD258), determined *in vivo*, were found at 71.3 μM and 13 μM , respectively (Cisternino et al., 2003a, 2003b). Taken as a whole, the saturable uptake of PKRinh observed at the BBB level, its active efflux with a K_m value in the micro-molar range, as well as the high expression of the P-gp at the luminal membrane of brain capillaries

endothelial cells strongly suggest that PKRinh could be a substrate of P-gp at the BBB. In addition, this hypothesis is supported by the high hydrophobicity of PKRinh ($\text{cLogP} = 5.1$), its molecular weight at around 500 Da, along with a high caco-2 efflux BA/AB ratio (~ 3) (Ambudkar et al., 1999; Faassen et al., 2003; Karlsson et al., 1993; Klopman et al., 1997; Schinkel, 1999; Schinkel and Jonker, 2003). Our data obtained in TKO ($\text{mdr1a/1b/bcrp}^{-/-}$) and WT mice, in the presence or absence of the P-gp inhibitor PSC833 (Cisternino et al., 2004), confirmed the involvement of P-gp, but not Bcrp, in the PKRinh efflux through the BBB. Indeed, its efflux ratio (ER) obtained in WT (FVB) mice co-perfused with or without PSC833 ($\text{ER}^{\text{PSC833/Ctrl}} = 3.6$) was exactly the same than that obtained in TKO vs. WT (FVB) mice ($\text{ER}^{\text{TKO/WT}} = 3.6$) and was very close to that obtained in WT (C57BL/6) mice perfused with or without saturating PKRinh concentration ($\text{ER}^{\text{saturating C/non saturating C}} = 3.9$).

Thus, the question was to determine if the P-gp was or not saturated at circulating PKRinh concentrations, which could increase the risk of potential neurotoxic events and the occurrence of drug-drug interactions with other P-gp substrates. It is noteworthy that only the unbound fraction of a drug can be transported by the P-gp at the BBB. The higher unbound blood concentration reached in our study is the C_{max} of the 100 mg/kg dose i.e. 9 ng/ml, far lower than the P-gp K_m ($=3.04 \mu\text{M} \sim 1510 \text{ ng/ml}$), suggesting that the P-gp at the BBB is not saturated by the circulating unbound concentrations of PKRinh for doses ranging from 10 to 100 mg/kg. These data are in good accordance with the dose-proportional brain PK of PKRinh that we found by traditional PK approach.

Because of its efflux pump function, low substrate selectivity and broad expression at the BBB, the P-gp is often involved in the restriction of drug transport through the BBB. Thus, being a P-gp substrate is responsible for drugs to have a poor BBB rate transport (Ambudkar et al., 1999; Cordon-Cardo et al., 1989; Schinkel, 1999; Thiebaut et al., 1987). Indeed, among all the drugs which transport across the BBB has been investigated by *in situ* brain perfusion in rodents, P-gp substrates have extremely low K_{in} values in non-saturating conditions, except for amitriptyline and sertraline which, despite being P-gp substrates, have a K_{in} equal to 55.9 and 34.2–73.2 $\mu\text{l/g/s}$, respectively (Dagenais et al., 2009; Summerfield et al., 2007). However, their *in vivo* efflux ratios ($\text{ER}^{\text{mdr1a(-/-)/WT}}$) are close to unity, (1.2 for amitriptyline (Dagenais et al., 2009), 1.0 or 1.1 for sertraline (Dagenais et al., 2009; Kikuchi et al., 2013)), showing that P-gp might not really restrict their BBB diffusion. On the contrary, the K_{in} of many good P-gp substrates which brain ER is higher than 2, such as vinblastine ($\text{ER} = 2.7$: (Cisternino et al., 2001), cabazitaxel ($\text{ER} = 2.9$: (Cisternino et al., 2003a)), but also colchicine ($\text{ER} = 3.0$: (Cisternino et al., 2001; Dagenais et al., 2000), quinidine ($\text{ER} \approx 6$: (Obradovic et al., 2007a) or loperamide ($\text{ER} \approx 5$: (Obradovic et al., 2007a)) were lower than 1 $\mu\text{l/g/s}$ in rodents (Cisternino et al., 2003b; Drion et al., 1996; Obradovic et al., 2007b). We showed that PKRinh has a high brain uptake (K_{in} value in non-saturating conditions $\approx 14 \mu\text{l/g/s}$). This level of K_{in} is usually observed

for molecules that have a high BBB permeability due to their physicochemical properties and/or to the involvement of BBB influx transporters as observed, for instance, for cholesterol ($K_{in} = 10.6 \mu\text{L/g/s}$) (Do et al., 2011), cocaine ($K_{in} = 19 \mu\text{L/g/s}$) (Chapay et al., 2015b) or nicotine ($K_{in} = 18 \mu\text{L/g/s}$) (Cisternino et al., 2013). The case of PKRinh is of particular interest since it has a high K_{in} although it is a good P-gp substrate ($ER \approx 4$). Thus, in non-saturating conditions, PKRinh has a K_{in} that is at least 14 times higher than all other known xenobiotics with similar P-gp ER properties.

The high BBB permeability of PKRinh might be due either to its physicochemical properties or to the involvement of an influx transporter. Our data did not reveal the involvement of any of the influx transporters tested (i.e. neither Oatp1a4, nor Oatp14, Oatp1a1, OCT1, OCT2, OAT3, LAT1, H^+ -antiporter). But, we cannot exclude that another influx transporter, not characterized yet, may be involved in the PKRinh influx through the BBB. Nevertheless, our data suggest that the high PKRinh K_{in} value may rather be attributed to its favorable physicochemical properties (molecular weight < 500 g/mol and high lipophilicity). This hypothesis is supported by the PKRinh K_{in} values we obtained at P-gp saturating concentration or when P-gp was lacking or inhibited. Indeed, these values were found at around $51 \mu\text{L/g/s}$, i.e. very close to that of flow-dependent molecules such as buspirone ($K_{in} = 54.2 \mu\text{L/g/s}$), chlorpromazine ($K_{in} = 50 \mu\text{L/g/s}$) (Dagenais et al., 2009) or diazepam ($K_{in} = 42.3$ to $52 \mu\text{L/g/s}$) (Alata et al., 2015; Cattelotte et al., 2008), meaning that PKRinh becomes a flow-dependent molecule when P-gp is non-functional.

In spite of the extensive research conducted on the P-gp since its discovery in 1976, its functional and biochemical properties are not yet fully understood, especially regarding the fact that such a vast number of structurally unrelated compounds can be recognized by the same transporter. Indeed, several hundred of P-gp substrates have been identified, and the list is growing constantly (Löscher and Potschka, 2005; Schinkel and Jonker, 2003). CNS pharmacokinetic properties of PKRinh enriched the knowledge in which high capacity P-gp substrate could also exhibit CNS activity depending both on their passive BBB rate and binding/distribution property to the brain tissue.

5. Conclusion

In conclusion, we showed that PKRinh brain accumulation was linear between 10 and 100 mg/kg, in spite of a non-linear systemic PK. We evidenced that PKRinh brain transport was composed of a passive flux through the BBB and an active protein-mediated efflux with a K_m of $3 \mu\text{M}$. Using P-gp/Bcrp deficient mice as well as P-gp inhibitor, we showed that PKRinh was a P-gp substrate at the mouse BBB and that this efflux was not saturated at circulating concentrations. Moreover, the case of PKRinh is of particular interest because its K_{in} is high ($14 \mu\text{L/g/s}$) despite being a good P-gp substrate ($ER^{TKO/WT} = 3.6$) and without being carried in the brain by any of the characterized influx transporter.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.02.005>.

Acknowledgements

This work was supported by Sanofi. We thank the Animal Platform, CRP2 - UMS 3612 CNRS - US25 Inserm-IRD – Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France, for taking care of animals.

References

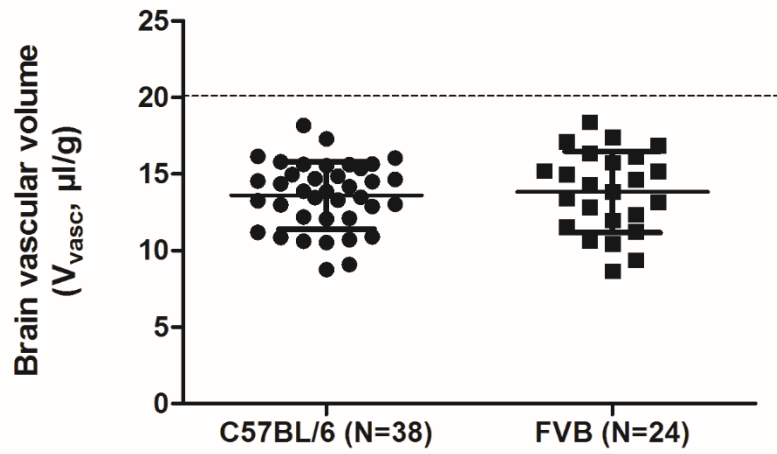
- Abbott, N.J., 2013. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J. Inher. Metab. Dis.* 36, 437–449. <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-013-9608-0>.
- Abbott, N.J., Friedman, A., 2012. Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease. *Epilepsia* 53 (Suppl. 6), 1–6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03696.x>.
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37, 13–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>.
- Abraham, N., Stojdl, D.F., Duncan, P.I., Méthot, N., Ishii, T., Dubé, M., Vanderhyden, B.C., Atkins, H.L., Gray, D.A., McBurney, M.W., Koromilas, A.E., Brown, E.G., Sonenberg, N., Bell, J.C., 1999. Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J. Biol. Chem.* 274, 5953–5962.
- Achira, M., Suzuki, H., Ito, K., Sugiyama, Y., 1999. Comparative studies to determine the selective inhibitors for P-glycoprotein and cytochrome P4503A4. *AAPS Pharm. Sci.* 1, E18.
- Alata, W., Ye, Y., St-Amour, I., Vandal, M., Calon, F., 2015. Human apolipoprotein E ϵ 4 expression impairs cerebral vascularization and blood-brain barrier function in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 86–94. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2014.172>.
- Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M., 1999. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 361–398. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361>.
- Avdeef, A., Sun, N., 2011. A new in situ brain perfusion flow correction method for lipophilic drugs based on the pH-dependent Crone-Renkin equation. *Pharm. Res.* 28, 517–530. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-010-0298-0>.
- Boesch, D., Gavériaux, C., Jachez, B., Pourtier-Manzanedo, A., Bollinger, P., Loo, F., 1991. In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833. *Cancer Res.* 51, 4226–4233.
- Bose, A., Mouton-Liger, F., Paquet, C., Mazot, P., Vigny, M., Gray, F., Hugon, J., 2011. Modulation of tau phosphorylation by the kinase PKR: implications in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 21, 189–200. (Zurich Switzerland). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00437.x>.
- Bourasset, F., Bernard, K., Muñoz, C., Genissel, P., Scherrmann, J.-M., 2005. Neuropharmacokinetics of a new alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) modulator, S18986 [S]-2,3-dihydro-[3,4]cyclopentano-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide, in the rat. *Drug Metab. Dispos.* 33, 1137–1143. <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.105.004424>.
- Bourdet, D.L., Pritchard, J.B., Thakker, D.R., 2005. Differential substrate and inhibitory activities of ranitidine and famotidine toward human organic cation transporter 1 (hOCT1; SLC22A1), hOCT2 (SLC22A2), and hOCT3 (SLC22A3). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 1288–1297. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.105.091223>.
- Cattelotte, J., André, P., Ouellet, M., Bourasset, F., Scherrmann, J.-M., Cisternino, S., 2008. In situ mouse carotid perfusion model: glucose and cholesterol transport in the eye and brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1449–1459. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2008.34>.
- Cha, S.H., Sekine, T., Fukushima, J.I., Kanai, Y., Kobayashi, Y., Goya, T., Endou, H., 2001. Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol. Pharmacol.* 59, 1277–1286.
- Chang, R.C.-C., Suen, K.-C., Ma, C.-H., Elyaman, W., Ng, H.-K., Hugon, J., 2002. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha in neuronal degeneration. *J. Neurochem.* 83, 1215–1225.
- Chapay, H., André, P., Declèves, X., Scherrmann, J.-M., Cisternino, S., 2015a. A poly-specific drug/proton antiporter mediates diphenhydramine and clonidine transport at the mouse blood-retinal barrier. *Br. J. Pharmacol.* 172, 4714–4725. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13246>.
- Chapay, H., Smirnova, M., André, P., Schlatter, J., Chiadmi, F., Couraud, P.-O., Scherrmann, J.-M., Declèves, X., Cisternino, S., 2015b. Carrier-mediated cocaine transport at the blood-brain barrier as a putative mechanism in addiction liability. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18. <http://dx.doi.org/10.1093/ijnp/pty001>.
- Chapay, H., Saubamea, B., Tournier, N., Bourasset, F., Behar-Cohen, F., Declèves, X., Scherrmann, J.-M., Cisternino, S., 2016. Blood-brain and retinal barriers show dissimilar ABC transporter impacts and concealed effect of P-glycoprotein on a novel verapamil influx carrier. *Br. J. Pharmacol.* 173, 497–510. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13376>.
- Cisternino, S., Rousselle, C., Dagenais, C., Scherrmann, J.-M., 2001. Screening of multidrug-resistance sensitive drugs by in situ brain perfusion in P-glycoprotein-deficient mice. *Pharm. Res.* 18, 183–190.
- Cisternino, S., Bourasset, F., Archimbaud, Y., Sémond, D., Sanderink, G., Scherrmann, J.-M., 2003a. Nonlinear accumulation in the brain of the new taxoid TXD258 following saturation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier in mice and rats. *Br. J. Pharmacol.* 138, 1367–1375. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705150>.
- Cisternino, S., Rousselle, C., Debray, M., Scherrmann, J.-M., 2003b. In vivo saturation of the transport of vinblastine and colchicine by P-glycoprotein at the rat blood-brain barrier. *Pharm. Res.* 20, 1607–1611.
- Cisternino, S., Rousselle, C., Debray, M., Scherrmann, J.-M., 2004. In situ transport of vinblastine and selected P-glycoprotein substrates: implications for drug-drug interactions at the mouse blood-brain barrier. *Pharm. Res.* 21, 1382–1389.
- Cisternino, S., Chapay, H., André, P., Smirnova, M., Debray, M., Scherrmann, J.-M., 2013. Coexistence of passive and proton antiporter-mediated processes in nicotine transport at the mouse blood-brain barrier. *AAPS J.* 15, 299. <http://dx.doi.org/10.1208/s12248-012-9434-6>.
- Colthurst, D.R., Campbell, D.G., Proud, C.G., 1987. Structure and regulation of eukaryotic initiation factor eIF-2. Sequence of the site in the alpha subunit phosphorylated by the haem-controlled repressor and by the double-stranded RNA-activated inhibitor. *Eur. J. Biochem.* 166, 357–363.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., Bertino, J.R., 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 695–698.

- Dagenais, C., Rousselle, C., Pollack, G.M., Scherrmann, J.M., 2000. Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 381–386. <http://dx.doi.org/10.1097/00004647-200002000-00020>.
- Dagenais, C., Avdeef, A., Tsinman, O., Dudley, A., Beliveau, R., 2009. P-glycoprotein deficient mouse in situ blood-brain barrier permeability and its prediction using an in combo PAMPA model. *Eur. J. Pharm. Sci.* 38, 121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2009.06.009>.
- Do, T.M., Ouellet, M., Calon, F., Chimini, G., Chacun, H., Farinotti, R., Bourasset, F., 2011. Direct evidence of abca1-mediated efflux of cholesterol at the mouse blood-brain barrier. *Mol. Cell. Biochem.* 357, 397–404. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-011-0910-6>.
- Do, T.M., Bedussi, B., Chasseigneux, S., Dodacki, A., Yapo, C., Chacun, H., Scherrmann, J.-M., Farinotti, R., Bourasset, F., 2013. Oatp1a4 and an L-tyrosine-sensitive transporter mediate the mouse blood-brain barrier transport of amyloid- β peptide. *J. Alzheimers Dis.* 36, 555–561 (JAD). <https://doi.org/10.3233/JAD-121891>.
- Dresser, M.J., Gray, A.T., Giacomini, K.M., 2000. Kinetic and selectivity differences between rodent, rabbit, and human organic cation transporters (OCT1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 1146–1152.
- Drion, N., Lemaire, M., Lefauconnier, J.M., Scherrmann, J.M., 1996. Role of P-glycoprotein in the blood-brain transport of colchicine and vinblastine. *J. Neurochem.* 67, 1688–1693.
- Dumurgier, J., Mouton-Liger, F., Lapalus, P., Prevot, M., Laplanche, J.-L., Hugon, J., Paquet, C., Groupe d'Investigation du Liquide Céphalorachidien (GIL) Study Network, 2013. Cerebrospinal fluid PKR level predicts cognitive decline in Alzheimer's disease. *PLoS One* 8, e53587. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0053587>.
- Faassen, F., Vogel, G., Spanings, H., Vromans, H., 2003. Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs. *Int. J. Pharm.* 263, 113–122.
- Fricker, G., Drewe, J., Huwyler, J., Gutmann, H., Beglinger, C., 1996. Relevance of p-glycoprotein for the enterol absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation. *Br. J. Pharmacol.* 118, 1841–1847.
- Giudicelli, C., Dricot, E., Moati, F., Strolin-Benedetti, M., Giudicelli, J.-F., 2004. Is it important to correct apparent drug tissue concentrations for blood contamination in the dog? *Fundam. Clin. Pharmacol.* 18, 281–286. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-8206.2004.00246.x>.
- Hammarlund-Udenaes, M., Paalzow, L.K., de Lange, E.C., 1997. Drug equilibration across the blood-brain barrier—pharmacokinetic considerations based on the microdialysis method. *Pharm. Res.* 14, 128–134.
- Ill-Raga, G., Palomer, E., Wozniak, M.A., Ramos-Fernández, E., Bosch-Morató, M., Tajés, M., Guix, F.X., Galán, J.J., Clarimón, J., Antúnez, C., Real, L.M., Boada, M., Itzhaki, R.F., Fandos, C., Muñoz, F.J., 2011. Activation of PKR causes amyloid β -peptide accumulation via de-repression of BACE1 expression. *PLoS One* 6, e21456. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021456>.
- Jacquemin, E., Hagenbuch, B., Stieger, B., Wolkoff, A.W., Meier, P.J., 1994. Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 133–137.
- Karlsson, J., Kuo, S.M., Ziemniak, J., Artursson, P., 1993. Transport of celiprolol across human intestinal epithelial (Caco-2) cells: mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1009.
- Kaufman, R.J., 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: co-ordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 13, 1211–1233.
- Kikuchi, R., de Moraes, S.M., Kalvass, J.C., 2013. In vitro P-glycoprotein efflux ratio can predict the in vivo brain penetration regardless of biopharmaceutics drug disposition classification system class. *Drug Metab. Dispos.* 41, 2012–2017. <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.113.053868>.
- Klopman, G., Shi, L.M., Ramu, A., 1997. Quantitative structure-activity relationship of multidrug resistance reversal agents. *Mol. Pharmacol.* 52, 323–334.
- Kullak-Ublick, G.A., Hagenbuch, B., Stieger, B., Wolkoff, A.W., Meier, P.J., 1994. Functional characterization of the basolateral rat liver organic anion transporting polypeptide. *Hepatology* 20, 411–416.
- Lin, J.H., Yamazaki, M., 2003. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 59–98. <http://dx.doi.org/10.2165/00003088-200342010-00003>.
- Löscher, W., Potschka, H., 2005. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* 2, 86–98. <http://dx.doi.org/10.1602/neurorx.2.1.86>.
- Makhey, V.D., Guo, A., Norris, D.A., Hu, P., Yan, J., Sinko, P.J., 1998. Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells. *Pharm. Res.* 15, 1160–1167.
- Ming, X., Ju, W., Wu, H., Tidwell, R.R., Hall, J.E., Thakker, D.R., 2009. Transport of dicationic drugs pentamidine and furamidine by human organic cation transporters. *Drug Metab. Dispos.* 37, 424–430. <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.108.024083>.
- Mouton-Liger, F., Paquet, C., Dumurgier, J., Lapalus, P., Gray, F., Laplanche, J.-L., Hugon, J., Groupe d'Investigation du Liquide Céphalorachidien Study Network, 2012a. Increased cerebrospinal fluid levels of double-stranded RNA-dependant protein kinase in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 71, 829–835. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.11.031>.
- Mouton-Liger, F., Paquet, C., Dumurgier, J., Bouras, C., Pradier, L., Gray, F., Hugon, J., 2012b. Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 α pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 885–896. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2012.01.009>.
- Mouton-Liger, F., Rebillat, A.-S., Gourmaud, S., Paquet, C., Leguen, A., Dumurgier, J., Bernadelli, P., Taupin, V., Pradier, L., Rooney, T., Hugon, J., 2015. PKR down-regulation prevents neurodegeneration and β -amyloid production in a thiamine-deficient model. *Cell Death Dis.* 6, e1594. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.552>.
- Müller, J., Lips, K.S., Metzner, L., Neubert, R.H.H., Koepsell, H., Brandsch, M., 2005. Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem. Pharmacol.* 70, 1851–1860. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.09.011>.
- Obrovac, T., Dobson, G.G., Rager, J., Hidalgo, L.J., 2007a. Utility of the Pgp Knockout Mouse In Situ Brain Perfusion to Determine the Brain Penetration Potential of Pgp Substrate Drugs. (Presented at the AAPS).
- Obrovac, T., Dobson, G.G., Shingaki, T., Kungu, T., Hidalgo, L.J., 2007b. Assessment of the first and second generation antihistamines brain penetration and role of P-glycoprotein. *Pharm. Res.* 24, 318–327. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-006-9149-4>.
- O'Connor, T., Sadleir, K.R., Maus, E., Velliquette, R.A., Zhao, J., Cole, S.L., Eimer, W.A., Hitt, B., Bembinsten, L.A., Lammich, S., Lichtenthaler, S.F., Hébert, S.S., De Strooper, B., Haass, C., Bennett, D.A., Vassar, R., 2008. Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* 60, 988–1009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.047>.
- Ose, A., Kusuhashi, H., Endo, C., Tohyama, K., Miyajima, M., Kitamura, S., Sugiyama, Y., 2010. Functional characterization of mouse organic anion transporting peptide 1a4 in the uptake and efflux of drugs across the blood-brain barrier. *Drug Metab. Dispos.* 38, 168–176. <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.109.029454>.
- Paquet, C., Dumurgier, J., Hugon, J., 2015. Pro-apoptotic kinase levels in cerebrospinal fluid as potential future biomarkers in Alzheimer's disease. *Front. Neurol.* 6, 168. <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2015.00168>.
- Patel, C.V., Handy, I., Goldsmith, T., Patel, R.C., 2000. PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. *J. Biol. Chem.* 275, 37993–37998. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M004762200>.
- Peel, A.L., Bredesen, D.E., 2003. Activation of the cell stress kinase PKR in Alzheimer's disease and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 14, 52–62.
- Ronaldson, P.T., Davis, T.P., 2013. Targeted drug delivery to treat pain and cerebral hypoxia. *Pharmacol. Rev.* 65, 291–314. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.112.005991>.
- Ronaldson, P.T., Finch, J.D., Demarco, K.M., Quigley, C.E., Davis, T.P., 2011. Inflammatory pain signals an increase in functional expression of organic anion transporting polypeptide 1a4 at the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 827–839. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.110.174151>.
- Ruvolo, P.P., 2001. Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia* 15, 1153–1160.
- Schinkel, A.H., 1999. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36, 179–194.
- Schinkel, A.H., Jonker, J.W., 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 3–29.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L., 1996. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest.* 97, 2517–2524. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI118699>.
- Shawahna, R., Uchida, Y., Declèves, X., Ohtsuki, S., Yousif, S., Dauchy, S., Jacob, A., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P.-O., Terasaki, T., Scherrmann, J.-M., 2011. Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol. Pharm.* 8, 1332–1341. <http://dx.doi.org/10.1021/mp200129p>.
- Smith, Q.R., 1996. Brain perfusion systems for studies of drug uptake and metabolism in the central nervous system. *Pharm. Biotechnol.* 8, 285–307.
- Stephens, R.H., O'Neill, C.A., Warhurst, A., Carlson, G.L., Rowland, M., Warhurst, G., 2001. Kinetic profiling of P-glycoprotein-mediated drug efflux in rat and human intestinal epithelia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 584–591.
- Summerfield, S.G., Read, K., Begley, D.J., Obrovac, T., Hidalgo, L.J., Coggon, S., Lewis, A.V., Porter, R.A., Jeffrey, P., 2007. Central nervous system drug disposition: the relationship between in situ brain permeability and brain free fraction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322, 205–213. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.107.121525>.
- Sweet, D.H., Miller, D.S., Pritchard, J.B., Fujiwara, Y., Beier, D.R., Nigam, S.K., 2002. Impaired organic anion transport in kidney and choroid plexus of organic anion transporter 3 (Oat3 (Slc22a8)) knockout mice. *J. Biol. Chem.* 277, 26934–26943. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M203803200>.
- Takasato, Y., Rapoport, S.I., Smith, Q.R., 1984. An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am. J. Phys.* 247, H484–493.
- Terasaki, T., Pardridge, W.M., 2000. Targeted drug delivery to the brain: (blood-brain barrier, efflux, endothelium, biological transport). *J. Drug Target.* 8, 353–355. <http://dx.doi.org/10.3109/10611860008997911>.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C., 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7735–7738.
- Tohyama, K., Kusuhashi, H., Sugiyama, Y., 2004. Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier. *Endocrinology* 145, 4384–4391. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2004-0058>.
- Tunblad, C., Jonsson, E.N., Hammarlund-Udenaes, M., 2003. Morphine blood-brain barrier transport is co-influenced by probenecid co-administration. *Pharm. Res.* 20, 618–623.
- Wijnholds, J., deLange, E.C., Scheffer, G.L., van den Berg, D.J., Mol, C.A., van der Valk, M., Schinkel, A.H., Scheper, R.J., Breimer, D.D., Borst, P., 2000. Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J. Clin. Invest.* 105, 279–285. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI8267>.
- Xie, R., Bouw, M.R., Hammarlund-Udenaes, M., 2000. Modelling of the blood-brain barrier transport of morphine-3-glucuronide studied using microdialysis in the rat:

- involvement of probenecid-sensitive transport. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1784–1792. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0703759>.
- Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S.H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., Tani, Y., Taketani, Y., Uchino, H., Kim, J.Y., Inatomi, J., Okayasu, I., Miyamoto, K., Takeda, E., Goya, T., Endou, H., 2001. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1514, 291–302. [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00384-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00384-4).
- Zhang, L., Schaner, M.E., Giacomini, K.M., 1998. Functional characterization of an organic cation transporter (hOCT1) in a transiently transfected human cell line (HeLa). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 354–361.
- Zhang, W., Xiong, X., Chen, L., Liu, M., Xiong, Y., Zhang, H., Huang, S., Xia, C., 2016. Hepatic uptake mechanism of ophiopogonin D mediated by organic anion transporting polypeptides. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 1–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s13318-016-0384-8>.
- Zhu, P.J., Huang, W., Kalikulov, D., Yoo, J.W., Placzek, A.N., Stoica, L., Zhou, H., Bell, J.C., Friedlander, M.J., Krnjević, K., Noebels, J.L., Costa-Mattioli, M., 2011. Suppression of PKR promotes network excitability and enhanced cognition by interferon- γ -mediated disinhibition. *Cell* 147, 1384–1396. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.029>.
- Zolk, O., Solbach, T.F., König, J., Fromm, M.F., 2009. Structural determinants of inhibitor interaction with the human organic cation transporter OCT2 (SLC22A2). *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 379, 337–348. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-008-0369-5>.

Supplementary Data

Figure S1. Brain vascular volumes (V_{vasc} , $\mu\text{l/g}$) in C57BL/6 and FVB mice



Article 3

Article 3: Modifications of the functional integrity of the blood-brain barrier of p25 mice, an inducible mouse model of severe neurodegeneration, and consequences on the brain uptake of a CNS disorders drug candidate.

C. Taccola, P. Barneoud, S. Cartot-Cotton, D. Valente, N. Schussler, B. Saubaméa, S. Chasseigneaux, V. Cochois, V. Mignon, E. Curis, M. Lochus, S. Nicolic, A. Dodacki, X. Declèves, F. Bourasset

Article en préparation pour soumission dans le journal « Journal of Alzheimer's Disease ».

Introduction

Il est connu depuis longtemps que des mutations sur les gènes codant pour l'APP ou les présénilines 1 et 2 sont responsables d'une augmentation de la production, et donc de l'accumulation du peptide A β dans la FAD. Dans les formes sporadiques de la MA en revanche, l'origine des lésions neuropathologiques n'est toujours pas connue avec précision. Il a été suggéré qu'un défaut de la clairance cérébrale de l'A β , provenant d'une altération de l'équilibre entre son influx et son efflux à la BHE, puisse avoir un rôle dans la pathogénèse de la MA. De plus, une altération de l'homéostasie cérébrale du cholestérol semble également jouer un rôle important dans le processus amyloïdogénique et l'apparition des anomalies cérébrovasculaires dans la MA. Les mécanismes gouvernant le transport du peptide A β et du cholestérol à la BHE sont complexes et impliquent de nombreux récepteurs et transporteurs dont certains sont communs aux deux substrats. Des études ont montré que l'expression et/ou de la fonction de ces récepteurs et transporteurs sont modifiés chez les patients atteints de la MA et dans des modèles murins de la MA mais aucune étude n'a à ce jour été réalisée dans un modèle de ND présentant une atrophie cérébrale et une pathologie Tau, en l'absence de pathologie amyloïde.

Objectifs

Les objectifs de cet article sont d'explorer l'expression et la fonction de différents récepteurs et transporteurs exprimés à la BHE de la souris p25 après 3 et 6 semaines d'induction. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux récepteurs et transporteurs impliqués dans l'influx et l'efflux cérébral du peptide A β et du cholestérol, et à la P-gp qui est le transporteur d'efflux de PKRinh ([Article](#)

2). Enfin, nous avons étudié le passage de PKRinh au travers de la BHE de la souris p25 à 6 semaines d'induction.

Méthodes

De la même façon que dans l'[Article 1](#), nous avons mesuré l'expression des gènes codant pour les récepteurs et transporteurs auxquels nous nous sommes intéressés par qRT-PCR sur microvaisseaux cérébraux isolés de souris p25 après 3 et 6 semaines d'induction et de leurs contrôles. L'expression protéique de la P-gp à la BHE a été mesurée par imagerie confocale sur coupes coronales fines de cerveaux. Enfin, les clairances d'entrée cérébrale du cholestérol et de PKRinh ont été mesurées par la technique de perfusion cérébrale *in situ*.

Principaux résultats

L'expression des gènes codant pour *Rage*, impliqué dans l'influx du peptide A β , et de tous les transporteurs d'efflux d'A β et du cholestérol, sauf la P-gp, est augmentée chez les souris p25 à 6 semaines d'induction. Nos résultats montrent également qu'*Abca1* et *Rage* sont régulés dès 3 semaines d'induction. Malgré ces modifications fonctionnelles de la BHE, la clairance d'entrée cérébrale du cholestérol est inchangée chez les souris p25 après 6 semaines d'induction, par rapport aux souris saines. Enfin, nous avons montré que la capacité d'efflux de la P-gp est augmentée chez les souris p25, entraînant une diminution significative de la clairance d'entrée cérébrale de PKRinh.

Conclusion

Nous avons montré que les souris p25 présentent d'importantes modifications de la fonctionnalité de leur BHE. Nous suggérons que pTau pourrait contribuer à la survenue de ces modifications, en plus des anomalies cérébrovasculaires que nous avons précédemment décrites ([Article 1](#)). Nous avons également montré, en utilisant PKRinh comme exemple de xénobiotique à visée cérébrale, substrat de la P-gp, que ces modifications pouvaient avoir des conséquences importantes sur son passage de la BHE, et donc potentiellement sur sa distribution cérébrale et son efficacité. Nos résultats soulèvent donc l'importance d'explorer les modifications de l'expression et/ou de la fonction de ces transporteurs chez l'Homme afin de mieux comprendre la physiopathologie et/ou de prédire le passage cérébral de xénobiotiques à visée cérébrale dans la MA.

Title: Modifications of the functional integrity of the blood-brain barrier of p25 mice, an inducible mouse model of severe neurodegeneration, and consequences on the brain uptake of a CNS disorders drug candidate.

Corresponding author: Fanchon Bourasset

Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

+331 53 73 98 59

fanchon.bourasset@parisdescartes.fr.

Authors: Camille Taccola^{1,4,5,6}, Pascal Barneoud², Sylvaine Cartot-Cotton¹, Delphine Valente², Nathalie Schussler², Bruno Saubaméa^{4,5,6}, Stéphanie Chasseigneaux^{4,5,6}, Véronique Cochois^{4,5,6}, Virginie Mignon^{4,5,6}, Emmanuel Curis^{4,5,7,8}, Murielle Lochus^{4,5,6}, Sophie Nicolic^{4,5,6}, Agnès Dodacki^{4,5,6}, Xavier Declèves^{4,5,6}, Fanchon Bourasset^{4,5,6}.

¹ Pharmacokinetics, Dynamics and Metabolism, Translational Medicine & Early Development, Sanofi, France.

² Neuroscience Therapeutic Area, Sanofi, France.

³ Drug Metabolism & Pharmacokinetics, Research platform, Sanofi, France.

⁴ Variabilité de Réponse aux Psychotropes, Inserm, U1144, Paris, F-75006, France.

⁵ Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, UMR-S 1144, Paris, F-75006, France.

⁶ Université Paris Diderot, UMR-S 1144, Paris, F-75013, France.

⁷ Laboratoire de biomathématiques, plateau iB²

⁸ Service de bioinformatique et statistique médicale, hôpital Saint-Louis, APHP

Keywords: Blood brain barrier; Neurodegeneration; efflux; P-gp; Cholesterol; A β , PKRinh

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease ; BBB, blood-brain barrier ; Cl_{up} , brain uptake clearance ; ND, neurodegeneration; CNS, central nervous system; $A\beta$, amyloid- β ; NFTs, neurofibrillary tangles; BBB, blood-brain barrier ; SLC, solute carriers; ABC, ATP-binding cassette transporters.

Abstract:

Cerebrovascular abnormalities, such as faulty cerebral clearance of neurotoxic agents, have been shown to contribute to chronic disease processes in neurodegenerative disorders, and especially in Alzheimer's disease (AD). We chose the p25 mice, an inducible mouse model of neurodegeneration (ND), to evaluate the functional integrity of the blood-brain barrier (BBB) in early (3 weeks) and later stage (6 weeks) of p25-induced ND. P25 mice display severe neuronal loss and brain atrophy as early as 3 weeks after induction initiation, as well as hyperphosphorylation of Tau protein (pTau) after 6 weeks of p25 induction. Our results showed a significant two-fold decrease of the brain uptake clearance of a known P-gp substrate (PKRinh) in p25 mice after 6 weeks of p25 induction, suggesting an increased P-gp-mediated efflux at the BBB, without any modification of the P-gp gene nor protein expression. Moreover, the mRNA expression of RAGE, implicated in amyloid- β peptide ($A\beta$) influx, and of all ATP-binding cassette (ABC) transporters involved in $A\beta$ and cholesterol efflux at the BBB, were up-regulated in p25 mice. These ABC transporters up-regulations might compensate for the increase of RAGE, and thus contribute to the lack of cerebral $A\beta$ accumulation in this mouse model after up to 6 weeks of p25 induction. Moreover, our data support the hypothesis of a key role for pTau in BBB functional modifications and provide insight for consequences of these modifications on the cerebral transport of CNS drug candidates.

Introduction

Neurodegenerative diseases are a common cause of mortality and morbidity worldwide, especially in the elderly [1]. This term gathers a group of typically late-onset, progressive disorders that are principally characterized by the injury and death of central nervous system (CNS) neurons [2]. The clinical features of neurodegenerative diseases are heterogeneous: the neuronal loss can induce movement disorders, also called ataxia, as in Parkinson's disease, cognitive disorders, also called dementia, as in Alzheimer's disease (AD), or both, as in Huntington's disease. However, they share similarities on the sub-cellular level such as the aggregation of misfolded proteins [3], [4], neuroinflammation [5], [6], calcium homeostasis alteration [7], [8], oxidative stress [9], [10], excitotoxicity [11], [12] and of course progressive loss of CNS neurons [2], [13]. Many studies suggest that cerebrovascular abnormalities contribute to chronic disease processes in neurodegenerative disorders [14]–[17]. Such abnormalities could include lower brain perfusion, morphological alterations of brain capillaries, insufficient delivery of nutrients, faulty cerebral clearance of neurotoxic agents, increased cerebral transport of pro-inflammatory agents, or even blood-brain barrier (BBB) breakdown [17]–[21]. Collectively, these abnormalities may be involved in disease progression, contribute to synaptic and neuronal dysfunction and accelerate the neuronal death. However, whether these abnormalities are a cause or a consequence of the neurodegeneration (ND) still needs investigations.

Dementias are responsible for the greatest clinical burden of neurodegenerative diseases, with AD representing the vast majority of dementia cases [22], thus being the most studied of all neurodegenerative diseases. Key neuropathological hallmarks of AD include neurofibrillary tangles (NFTs), mainly composed of accumulated intracellular hyperphosphorylated Tau protein (pTau) [23], and amyloid plaques, formed by extracellular aggregation of amyloid- β peptide (A β) [24], [25]. The physical and functional integrity of the BBB has been studied in various transgenic mouse models of AD, including models which accumulate A β [26]–[28], or both, A β and pTau [26], [29], [30] in the brain, or which carry

the main genetic risk factor for sporadic AD (*APOE ε4*; APOE4 mice) [31]. But little is known about the BBB alterations in a context of ND and pTau, in the absence of senile plaques. The p25 model is a bitransgenic mouse model of severe ND that inducibly overexpresses the human p25 protein in the forebrain, under the control of the CamKII promoter (CamKII-TetOp25) [32]. These mice, further referred as “p25 mice” in this article, exhibit a rapid ND after transgene (human p25) induction with an extensive neuronal loss in the cortex and hippocampus as well as a 16% and 29% brain atrophy at 3 and 6 weeks of p25 induction (ON), respectively [32]–[35]. These mice also display key pathological hallmarks of AD. The phosphorylation of Tau is increased from 5 weeks ON (with 15 vs. 6 phosphorylated Tau sites identified in p25 and WT mice respectively), and the presence of NFTs is detected later, over 27 weeks ON [32]. These mice also showed synaptic dysfunctions and cognitive impairments from 6 weeks ON [32], [34] as well as an intracellular accumulation of Aβ and extensive astrogliosis from 8 weeks ON [32], [36]. However, these mice do not display senile plaques [36]. We have shown that, despite the extensive ND, the brain vasculature surface as well as the physical integrity of the BBB were not altered in p25 mice after 3 and 6 weeks ON [35]. However, the cerebral D-glucose uptake was reduced [35], as previously observed in AD patients [37], [38] and in most of the mouse models of AD [26], [31]. Interestingly, p25 mice share similarities with 3xTg-AD mice in terms of cerebrovascular volume and basement membrane abnormalities, which were suggested to be attributed to pTau [26], [35]. In this latter model, we also recently reported several modulations of transporters and receptors expressed at their BBB, in particular of those involved in Aβ and cholesterol transport: the receptor for advanced glycation endproducts (Rage), the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) and ATP-binding cassette (ABC) transporters (P-gp, Bcrp, Abca1 and Abcg4) [30]. However, whether these BBB modulations are deleterious or benefit to the brain remain to be determined. In one hand, the neurovascular hypothesis of AD suggests that genetic and vascular risk factors can produce cerebrovascular modifications, including modulations of the BBB transporters or receptors [39]–[41], which can participate in the AD

pathogenesis [17], [21], [42], [43]. On the other hand, the up-regulation of ABC transporters involved in the brain efflux of both, A β and cholesterol, during human and/or murine AD, suggests a protective role of these ABC transporters from the brain accumulation of A β [30], [44], [45].

In this work, we aimed at studying the BBB function in a ND and pTau animal model. We thus measured the brain microvessels expression of several receptors/transporters in two stages of the pathology in p25 mice (3 and 6 weeks ON), by using quantitative RT-PCR and confocal imaging. We particularly evaluated, *in vivo*, the BBB functional property of ABC transporters involved in ND diseases and especially in AD, by using the *in situ* brain perfusion technique in 6 weeks ON p25 mice, a period of induction for which the mice display a severe ND, associated with pTau. We thus measured the brain uptake pharmacokinetic parameters of PKRinh, a CNS drug candidate which was shown to be a potent and specific P-gp substrate [46], and of cholesterol, in the presence or not of probucol, a known inhibitor of both, Abca1 and Abcg4 at the BBB level [47], [48].

Materials and methods

Drugs and chemicals

[¹⁴C]-sucrose (435.0 mCi/mmol), and [³H]-cholesterol (53.0 Ci/mmol) were purchased from PerkinElmer, USA. PKRinh, a specific P-gp substrate at the mouse BBB (P-gp efflux ratio $\approx$ 4) [46] was manufactured by Sanofi, France. [³H]-PKRinh (25.2 Ci/mmol) was manufactured by Sanofi, Germany. Probucol (used as Abca1 and Abcg4 inhibitor) was purchased from Sigma-Aldrich, USA. Ultima Gold XR[®] liquid scintillation cocktail and Solvable[®] tissue solubilizer were purchased from PerkinElmer, The Netherlands. RNA isolation kits (RNeasy Micro kit) were purchased from Qiagen, Germany. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) reagents were purchased from Invitrogen, France. Power SYBR[®] Green PCR Master Mix was purchased from ThermoFisher Scientific, USA. All other chemicals were reagent grade commercial products.

Animals

In this study, we used an inducible mouse model of human p25 overexpression in the postnatal forebrain; the CamKII-tTA-TetO-p25-eGFP mice, also known as p25 mice. These mice were created by Prof. Tsai and colleagues and were described for the first time in 2003 [32]. Briefly, they used the tetracycline-controlled transactivator (tTA) system to generate bitransgenic mice that inducibly overexpress human p25 under the control of the CamKII promoter, which drives specific transgene expression in the neurons of the forebrain (neocortex, hippocampus, amygdala and basal ganglia) [49]. In the presence of the tetracycline derivative doxycycline, expression of the *p25* transgene is inhibited. The transgene expression is turned ON when mice are switched to a doxycycline-free diet. All mice were thus conceived and raised for about 6 weeks in the presence of doxycycline (A04 diet + doxycycline 1 g/kg [32], Safe, France) before induction. Our studies were carried out after 3 and 6 weeks of *p25* induction, referred as “3 weeks ON” and “6 weeks ON” in this article. Males and females mice were used in an equivalent ratio in all experiments. The p25 mice as well as non-transgenic, same sex (whenever possible) littermate mice used as controls (referred as “WT mice”) were produced and provided by Charles River, France. They were housed in a pathogen-free environment maintained at 22 ± 2 °C with controlled humidity, a 12-hour light/12-hour dark cycle and access to food and tap water *ad libitum*. The acclimatization time before induction was at least 5 days. All experiments complied with the ethical rules of the European directive (2010/63/EU) for experimentation with laboratory animals and were approved by the ethics review committee of Paris Descartes university (study approval n° 12-182).

***In situ* brain perfusion**

The *in situ* brain perfusion method is commonly used to study drug transport processes occurring at the luminal side of the BBB [50]–[52]. This technique allows the measurement of distribution volumes and brain uptake coefficients of the p25 mice BBB after 3 and 6 weeks of *p25* induction. We assessed the function of the P-gp (Abcb1) transporter by measuring the brain uptake clearance of one of its

substrates: [^3H]-PKRinh. When necessary, unlabeled PKRinh was added to the perfusate at increasing concentrations (from 10 nM to 15 μM) which covered non-saturating and P-gp saturating concentrations [46]. We also assessed the function of Abca1 and Abcg4 transporters by measuring the brain uptake of one of their substrates : [^3H]-cholesterol [53]–[56], in the presence or absence of probucol. Probucol (10 μM) has been shown to be an inhibitor of Abca1 [53], [57] and Abcg4 [47], [48].

Surgical procedure and perfusion technique: WT and p25 mice were weighted and anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine-xylazine mixture (140 and 8 mg/kg respectively). The right common carotid artery was ligated on the heart side and the right external carotid artery was ligated at the level of its bifurcation from the common artery. The right common carotid was then catheterized with Heparin-filled polyethylene tubing (0.3 mm i.d. x 0.7 mm o.d.). The syringe containing the perfusion fluid was placed in an infusion pump (Harvard pump PHD 2000, Harvard Apparatus, France) and connected to the catheter. Just before perfusion, the thorax of the animal was opened and the heart was cut to ensure that the entire brain blood is replaced by the perfusion fluid. Perfusion started immediately at a flow rate of 2.5 ml/min. Each mouse was perfused with the [^3H]-substrate (0.3 $\mu\text{Ci/ml}$ for [^3H]-PKRinh, 0.2 $\mu\text{Ci/ml}$ for [^3H]-cholesterol) and [^{14}C]-sucrose as a vascular marker (0.1 $\mu\text{Ci/ml}$) for 1 minute. The Abca1/Abcg4 inhibitor (probucol, 10 μM) or unlabeled PKRinh (10 nM to 15 μM) were added to the perfusion fluid when necessary. The perfusion was terminated by decapitating the animal. The brain was removed from the skull and dissected on ice. The right brain hemisphere as well as aliquots of the perfusion fluid were placed in tared glass vials and weighted. Brain samples were digested in 2 ml of Solvable[®] for about 24h. Brain and perfusion fluid samples were mixed with 9 ml of Ultima Gold XR[®] scintillation cocktail. For all samples, ^3H and ^{14}C isotopes were counted simultaneously in a liquid scintillation counter (Tri-Carb[®] 2810 TR, PerkinElmer).

Perfusion fluid: The perfusion fluid consisted of Krebs bicarbonate-buffered physiological saline (in mM: 128 NaCl, 24 NaHCO_3 , 4.2 KCl, 2.4 NaH_2PO_4 , 1.5 CaCl_2 , 0.9 MgSO_4 and 9 D-Glucose) warmed at 37 °C and

gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ to obtain a pH of 7.4. [¹⁴C]-sucrose, [³H]-substrate ± unlabeled PKRinh ± probucol (diluted in DMSO) were added to the perfusate at the appropriate concentration depending on the experiment. DMSO did not exceed 0.5% of the perfusate.

Calculation of BBB transport parameters: Calculations were done as previously described [50]–[52], [58]. The brain vascular volume (V_{vasc} , µl/g) was estimated from the volume of tissue distribution of [¹⁴C]-sucrose, which is known for not crossing the BBB during short perfusion time. V_{vasc} was calculated as follows:

$$V_{\text{vasc}} = \frac{Q_{\text{sucrose}}}{C_{\text{sucrose}}} \quad (\text{Eq 1})$$

where Q_{sucrose} (dpm/g) is the amount of [¹⁴C]-sucrose in the right brain hemisphere and C_{sucrose} (dpm/µl) is the [¹⁴C]-sucrose concentration in the perfusion fluid. The apparent brain tissue distribution volume (V_d , µl/g) of [³H]-substrates were calculated as follows:

$$V_d = \frac{Q}{C_{\text{perf}}} \quad (\text{Eq 2})$$

where Q (dpm/g) is the amount of [³H]-substrate in the right brain parenchyma and C_{perf} (dpm/µl) is the [³H]-substrate concentration in the perfusion fluid. In order to account for vascular contamination of the brain hemisphere, Q was previously corrected by subtracting the [³H]-substrate remaining in the vascular space ($V_{\text{vasc}}C_{\text{perf}}$) from the total [³H]-substrate in the tissue sample (Q_{tot} , dpm/g):

$$Q = Q_{\text{tot}} - (V_{\text{vasc}} \times C_{\text{perf}}) \quad (\text{Eq 3})$$

The brain uptake parameter or “brain clearance” (K_{in} or Cl_{up} , µl/g/s), was calculated as follows:

$$Cl_{\text{up}} = \frac{V_d}{T} \quad (\text{Eq 4})$$

where T is the perfusion time in seconds. We have previously shown that, despite the extensive ND, the brain vasculature surface was not altered in p25 mice after 3 and 6 weeks ON, suggesting that the brain atrophy affected the brain parenchyma but not the cerebral microvessels [35]. This result has significant consequences in the way to calculate the brain transport parameters. Indeed, equations 2 and 4 show

that the volume of distribution (V_d) and brain uptake (Cl_{up}), are dependent on the amount of [^3H]-substrate in the right brain hemisphere (Q), which is expressed in d.p.m. per gram of brain. As the brain weight is decreased in p25 mice, dividing the total [^3H]-substrate brain amount by the total brain weight will apply a reduction of the weight on both, the brain parenchyma and the brain microvessels. But our data showed that the brain atrophy did not affect the brain microvessels, suggesting that the brain surface available for drug blood-brain exchange was unchanged between WT and p25 mice. Thus, dividing the total brain amount of the [^3H]-substrate by the total brain weight will introduce a bias and a systematic over-estimation of the brain amount of [^3H]-substrate. It is why we applied a correction factor to avoid this over-estimation of brain transport parameters and to reliably compare parameters obtained in WT and p25 mice.

For [^3H]-PKRinh, the permeability-surface area product (PS , $\mu l/g/s$) was calculated from Cl_{up} using the Crone-Renkin equation (CRE):

$$PS = -F \times \ln(1 - Cl_{up}/F) \quad (Eq\ 5)$$

where F represents the cerebral blood flow ($\mu l/g/s$) and was set to $F = 71.6 \mu l/g/s$, in accordance with previous published data on mouse *in situ* brain perfusion of lipophilic drugs [46], [59], [60]. The rate of drug uptake or “brain flux” of PKRinh (J_{net} , $\mu mol/g/s$) was calculated as follows:

$$J_{net} = PS \times C_{tot} \quad (Eq\ 6)$$

where C_{tot} is the total PKRinh concentration (radiolabeled and unlabeled PKRinh) in the perfusion fluid (μM).

PKRinh has been previously shown to cross the BBB by passive diffusion and to be a substrate of a P-gp-mediated efflux [46]. Its brain flux was shown to be modelled by a Michaelis-Menten equation which includes a non-saturable component (passive transport) and a saturable component (active efflux by the P-gp):

$$J_{net} = K_{passive} \times C_{tot} - \frac{V_{max} \times C_{tot}}{K_m + C_{tot}} \quad (Eq\ 7)$$

Where J_{net} is the net flux of PKRinh across the BBB ($\mu\text{mol/g/s}$), V_{max} is the maximal velocity of transport ($\mu\text{mol/g/s}$), K_m is the apparent Michaelis-Menten transport parameter ($\mu\text{mol}/\mu\text{l}$) which represents the concentration at the half-maximal carrier velocity, and K_{passive} is the unsaturable flux component ($\mu\text{l/g/s}$) with C_{tot} being expressed in $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$. PKRinh transport parameters have been previously estimated in C57BL/6 wild type mice as follows: $K_{\text{passive}} = 148.5 \pm 22.7 \mu\text{l/g/s}$, $V_{\text{max}} = 0.40^* \pm 0.22 \text{ nmol/g/s}$ and $K_m = 3.04 \pm 1.23 \mu\text{M}$ [46]. Because the physical integrity and passive diffusion through the BBB has been shown to be unaltered in p25 mice after up to 6 weeks of p25 induction [35], the passive unsaturable flux of PKRinh across the BBB should not be different in p25 mice. We thus decided to fix K_{passive} to $148 \mu\text{l/g/s}$ for both WT and p25 mice in our study. The data were thus fitted for V_{max} and K_m by nonlinear regression analysis with the equation 7, using the GraphPad Prism software:

$$J_{\text{net}} = 148.0 \times C_{\text{tot}} - \frac{V_{\text{max}} \times C_{\text{tot}}}{K_m + C_{\text{tot}}} \quad (\text{Eq 8})$$

Cortical microvessels isolation, mRNA extraction and Reverse Transcription (RT)

Cortical microvessels were obtained by mechanical homogenization from WT and p25 mice brains as previously described [61], [62]. Brains were dissected to isolate the cortex from olfactory bulbs, cerebellum, thalamus, white matter and meninges. For each sample, brain from 4 to 6 mice were pooled, minced in 30 ml of ice-cold buffer 1 (Hanks' balanced salt solution (HBSS) 1X + HEPES 10 mM (ThermoFisher Scientific)) and homogenized by 10 up-and-down strokes at 400 rpm using a Potter-Thomas homogenizer (Kontes Glass Inc, USA). The resulting homogenate was centrifuged at 600 g for 5 min at 4 °C. The microvessel-enriched pellet was suspended in 20 ml of buffer 2 (buffer 1 + 17.5% dextran (Sigma-Aldrich)) and centrifuged at 4500 g for 15 min at 4 °C to remove residual myelin. The resulting pellet was suspended in 35 ml of buffer 3 (buffer 1 + 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)), passed successively through a 100 μm (Falcon) and a 10 μm (Merck Milipore) mesh nylon filter. The cortical microvessels, retained on the 10 μm filter surface, were collected by agitation of the filter in

40 ml of buffer 3 and centrifuged at 1200 g for 10 min at 4 °C. The pellet was suspended in 5 ml of buffer 1 and centrifuged one more time at 1200 g for 10 min at 4 °C. The pellet was suspended in RLT buffer (Qiagen) containing 1% β -mercaptoethanol and sonicated for 4 min at a frequency of 30 strokes per second. The lysate was centrifuged at 16000 g for 10 min at 4 °C and the supernatant was saved for RNA extraction. Total RNA were extracted from each microvessels sample using RNeasy micro kits from Qiagen, according to the manufacturer's instructions. Briefly, samples were diluted 1/2 with 70% ethanol and placed in spin columns. Columns were washed with the appropriate buffer according to protocol and incubated 15 min at room temperature with DNase I (Qiagen) to avoid genomic DNA contamination of the samples. Columns were washed again with appropriate buffer and 80% ethanol and total RNA was finally eluted from columns with 14 μ l of DNase free water. The RNA concentration was determined for each sample at 260 nm using a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (ThermoScientific, USA). The RNA concentrations ranged from 25 to 120 ng/ μ l depending on the size of the sample. For each sample, 300 ng of extracted RNA were converted to cDNA using a SuperScript® II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) as previously described [63]. Briefly, the reverse transcription (RT) was performed in a final reaction mixture of 50 μ l containing 500 μ M of each dNTP, 10 mM of DTT, 1.5 μ M of random hexanucleotides primers, 50 U of ribonuclease inhibitor and 250 U of SuperScript® II reverse transcriptase. Samples were incubated 10 min at 25 °C, then 30 min at 42 °C and 5 min at 99 °C in a thermal cycler (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, France). cDNAs were kept at -80 °C until PCR analysis.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

The expression of genes encoding ABC transporters (Abca1, Abca2, Abcb1 (P-gp), Abcg1, Abcg2 (Bcrp) and Abcg4), low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) and receptor for advanced glycation end products (Rage) was measured by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) on a ABI Prism 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems, USA) using SYBR® Green fluorescence detection. All primers used for qRT-PCR (see Table 1) were designed by Oligo 7.60 software (Molecular Biology Insights,

USA), ordered from Eurogentech, Belgium and tested upstream on positive controls (untreated C57BL/6 mice cortex). Thermal cycling was carried out in a final volume of 20 μ l containing 10 μ l of SYBR® Green, 1 μ l of the forward primer (10 μ M), 1 μ l of the reverse primer (10 μ M) and 8 μ l of each sample diluted cDNA (1:20 in DNase free water). The thermal cycling conditions were 10 min at 95 °C, followed by 40 amplification cycles at 95 °C for 15 sec and 60 °C for 45 sec. Fluorescent output, measured as cycling time (Ct), is proportional to the log of cDNA concentration. The β -actin gene was used as an endogenous reference for normalizing target cDNAs. Data were analysed using the comparative Ct method ($\Delta\Delta$ Ct) to calculate relative gene expression. Δ Ct is the Ct difference between the gene of interest and the β -actin gene. For each gene of interest, $\Delta\Delta$ Ct was calculated by subtracting the Δ Ct of one sample from the average Δ Ct obtained in control animals (WT). The $\Delta\Delta$ Ct value of each gene was transformed to an absolute value reflecting the expression profile of each gene in each sample by the following formula: gene expression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Immunostaining and confocal microscopy

The P-gp protein expression at the BBB was determined by immunofluorescence microscopy. WT and p25 mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine-xylazine mixture (140 and 8 mg/kg respectively) and perfused transcardially with NaCl 0.9% for 1 min followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) for 12 min. Brains were carefully collected, immersed in the same fixative for 2h at 4 °C, rinsed and stored overnight in PBS at 4 °C. Coronal brain sections (50 μ m) in the region of the hippocampus (-2 mm from Bregma) were prepared using a vibratome (Leica VT 1000E, Leica microsystems GmbH, Germany), cryopreserved in PBS + 20% sucrose (3 changes in 24h) and frozen at -80 °C until immunohistofluorescence assay. Immunostaining was performed on free-floating sections under gentle rocking and at room temperature unless otherwise specified. Thorough PBS washing was performed after each incubation step. Frozen sections were thawed and rinsed 6 times in PBS to remove the remaining sucrose. Sections were pretreated with

Ethanol/Acetic acid (2:1/v:v) for 10 min at -20 °C in order to unmask P-gp epitopes and improve the staining [64] and permeabilized in PBS + 0.5% Triton X-100 (ThermoFisher Scientific) for 30 min. Sections were blocked for free aldehydes in PBS + 100 mM glycine for 20 min and incubated in PBS + 0.1% Triton X-100 (PBST) containing 10% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch, USA) and 1% BSA for 2h. Staining was performed by incubation in Mouse anti-P-gp antibodies (IgG1, Enzo Life Sciences, France) diluted 1/50 in PBST for 48h at 4 °C, followed by incubation in Goat anti-Mouse IgG1 Alexafluor® 555 antibodies (Invitrogen) diluted 1/500 in PBST for 24h. Nonspecific staining was controlled by omitting the primary antibody. Cell nuclei were counterstained with TOPRO-3 (ThermoFisher Scientific) diluted 1/500 for 20 min and sections were mounted in Glycerol/PBS (9:1/v:v) using 0.17 mm thick glass coverslips (Assistent, Germany). Images were recorded on a Leica SP8 confocal microscope (Leica microsystems GmbH) equipped with a 40X objective (numerical aperture = 1.30). All images were taken at a constant depth within the tissue (10 µm below the surface of the section) with constant acquisition parameters across all regions and animal. No detectable signal was observed when primary antibodies were omitted. Mean pixel intensity was quantified in Fiji [65] after image thresholding using the same threshold value for all images.

Statistical analysis

Data are shown as mean $\pm$ standard deviation (SD). When applicable, a Student's two-tailed unpaired t-test or a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-test was used to identify significant differences. Analyses were performed on GraphPad Prism software.

P-gp immunofluorescence data were analyzed using a linear mixed model on log-transformed values, using the mouse as a random effect, the side (right or left) and the genotype (WT or p25) as crossed fixed effects, with interaction. The model was fitted to maximize the likelihood, using the lme4 package. Analyses were performed using R software.

Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

For every *in situ* brain perfusion assay, the V_{vasc} was measured using [^{14}C]-sucrose and was always in agreement with the normal range, assessed in healthy mice (i.e. $V_{\text{vasc}} < 20 \mu\text{l/g}$) [50], [52] (**Supplementary data, Fig. S1**), confirming that the physical integrity of the BBB was not altered in p25 mice after up to 6 weeks ON. Moreover, the V_{vasc} was significantly decreased in the brain of p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice ($10.58 \pm 2.4 \mu\text{l/g}$ in p25 vs. $12.37 \pm 2.1 \mu\text{l/g}$ in WT (-14.5%), $p = 0.0048$, **Supplementary data, Fig. S1**), which is consistent with V_{vasc} data previously reported for p25 mice [35].

Gene expression of Rage and Oatp1a4 at the BBB of p25 mice

mRNA levels of genes coding for Rage (*Ager*) and Oatp1a4 (*Slco1a4*) in brain isolated microvessels of WT and p25 mice were measured by qRT-PCR. We found no significant difference in the *Ager* gene expression between WT and p25 mice brain microvessels after 3 weeks ON ($p = 0.1379$, data not shown), but a significant increase after 6 weeks ON (1.75 ± 0.2 in p25 vs. 1.01 ± 0.2 in WT, $p = 0.0089$, **Fig. 1. A**). However, we found no significant difference in the *Slco1a4* gene expression between WT and p25 mice brain microvessels after 3 ($p = 0.6199$, data not shown) or 6 weeks ON ($p = 0.1546$, **Fig. 1. B**).

P-gp expression and function at the BBB of p25 mice

We have investigated the gene and protein expression of the P-gp transporter in the brain microvessels of WT and p25 mice after 6 weeks ON, a period of induction for which the mice display a severe ND, associated with pTau. We showed by qRT-PCR that there is no significant difference in the *Abcb1a* gene expression in brain isolated microvessels of WT and p25 mice after 3 weeks ON ($p = 0.0875$, data not shown) or 6 weeks ON ($p = 0.0603$, **Fig. 2. A**). Consistently with this result, we found no significant difference in the P-gp protein expression between WT and p25 mice after 6 weeks ON (mean fluorescent intensity = 28.1 ± 0.9 in p25 mice vs. 32.0 ± 2.9 in WT mice, $p = 0.1049$, **Fig. 2. B**), by immunofluorescence microscopy on coronal brain sections.

We then explored the function of the P-gp in WT and p25 mice after 6 weeks ON, using *in situ* brain perfusion technique, to measure the brain transport parameters of [³H]-PKRinh, previously shown to be a P-gp substrate at the mouse BBB, at non P-gp-saturating concentration (10 nM) [46]. We showed a significant decrease in the [³H]-PKRinh brain uptake (Cl_{up}) in p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice ($7.2 \pm 2.2 \mu\text{l/g/s}$ in p25 mice vs. $13.8 \pm 3.1 \mu\text{l/g/s}$ in WT, $p = 0.0044$, **Fig. 2. C**). This result suggests an increase in the cerebral [³H]-PKRinh P-gp-mediated efflux in p25 mice, compared to WT mice. We also measured [³H]-PKRinh Cl_{up} in p25 mice after 6 weeks ON, with increasing concentrations of unlabeled PKRinh in the perfusate, up to the highest concentration achievable in an aqueous solution (from 10 nM to 15 μM). The 15 μM concentration of PKRinh in the perfusate fluid has previously been shown to saturate the P-gp in WT mouse [46]. The total brain flux (J_{net}) of PKRinh was then calculated for each sample using the Crone-Renkin equation (Eq6). J_{net} values calculated for p25 mice, as well as J_{net} values previously calculated in similar conditions for C57BL/6 wild-type mice, were fitted together to the total PKRinh perfusate concentrations (C_{tot}) by nonlinear regression analysis using the **equation 8 (Fig. 2 .D)**. The brain transport parameters of PKRinh in WT and p25 mice were found to be: $V_{max} = 0.54 \pm 0.08 \text{ nmol/g/s}$, $K_m = 3.97 \pm 0.65 \mu\text{M}$ for WT mice and $V_{max} = 1.80 \pm 0.15 \text{ nmol/g/s}$, $K_m = 13.0 \pm 1.16 \mu\text{M}$ in p25 mice (**Fig. 2 .D**). V_{max} and K_m are significantly increased in p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice ($p < 0.0001$ for both). Thus, these results showed a decrease of the affinity (K_m) and an increase of the maximal transport velocity (V_{max}) of the P-gp for PKRinh in p25 mice, compared to WT mice, leading to an unchanged intrinsic clearance ($Cl_{int} = \frac{V_{max}}{K_m}$).

Gene expression and function of sterols and A β efflux transporters at the BBB of p25 mice

Our data showed, by qRT-PCR, no difference in the expression of genes coding for A β and sterols efflux receptors or transporters in brain isolated microvessels between WT and p25 mice after 3 weeks ON, except for *Abca1* that was the only transporter significantly up-regulated in p25 mice as from 3 weeks ON ($\times 1.3$ in p25 vs. WT, $p = 0.0095$, data not shown). However, there is an up-regulation of all the genes

coding for A β and sterols efflux receptors or transporters (*Abcg2*, *Lrp1*, *Abca1*, *Abca2*, *Abcg1* and *Abcg4*) in brain isolated microvessels of p25 mice after 6 weeks ON, compared to WT mice (x 1.3 in p25 vs. WT, $p=0.012$ for *Abcg2*; x 2.1 in p25 vs. WT, $p=0.0089$ for *Lrp1*; x 1.7 in p25 vs. WT, $p=0.0012$ for *Abca1*; x 1.9 in p25 vs. WT, $p=0.0030$ for *Abca2*; x 1.9 in p25 vs. WT, $p=0.0003$ for *Abcg1*; 3.0 in p25 vs. WT, $p=0.035$ for *Abcg4*, **Fig. 3. A**).

We then measured, by *in situ* brain perfusion, the brain uptake (Cl_{up}) of [^3H]-cholesterol in the presence or absence of probucol (10 μM), a known inhibitor of *Abca1* and *Abcg4*, in WT and p25 mice after 6 weeks ON. We showed that probucol induced a significant increase in the cholesterol Cl_{up} in both, WT and p25 mice (26.1 ± 2.5 $\mu l/g/s$ vs. 10.2 ± 3.1 $\mu l/g/s$, $p < 0.0001$ in WT, 26.3 ± 3.1 $\mu l/g/s$ vs. 9.1 ± 2.3 $\mu l/g/s$, $p < 0.0001$ in p25) which confirms the ability of probucol to inhibit the efflux of cholesterol at the BBB (**Fig. 3. B**). These results are consistent with data reported previously for cholesterol with and without probucol [53]. There was no significant difference in cholesterol Cl_{up} between WT and p25 mice, neither when cholesterol was perfused alone (9.1 ± 2.3 $\mu l/g/s$ in p25 vs. 10.2 ± 3.1 $\mu l/g/s$ in WT, $p=0.5034$), nor when probucol was added to the perfusion fluid (26.1 ± 2.5 in p25 $\mu l/g/s$ vs. 26.3 ± 3.1 $\mu l/g/s$ in WT, $p=0.9090$, **Fig. 3. B**).

Discussion

We aimed at studying the BBB function in p25 mice, a mouse model of severe ND, after 3 and 6 weeks of *p25*-induced ND, in comparison with WT mice, and the consequences of possible BBB modifications on the BBB transport of cholesterol and PKRinh, a CNS drug candidate being a potent P-gp substrate [46].

Our data evidenced a significant two-fold decrease of the brain uptake clearance of a known P-gp substrate (PKRinh) in 6 weeks ON p25 mice, compared to WT. It is noteworthy that, to our knowledge, PKRinh is not substrate of other efflux nor influx transporters at the BBB level [46] and that the passive diffusion is not significantly different between 6 weeks ON p25 mice and WT mice [35]. Thus this

decrease of PKRinh brain uptake is likely to be due to the increase of the P-gp efflux and not to the modification of another transport component. We evidenced a significant 3.3-fold increase of the $V_{\max}$ of P-gp and a 3.3-fold decrease of its affinity for PKRinh, leading to a similar intrinsic clearance of PKRinh. These results suggest that the decrease of Cl_{up} in p25 mice might be due to a difference in P-gp expression rather than in P-gp function. However, even if the *Abcb1a* amount in p25 mice measured by qRT-PCR showed an increasing tendency ($p = 0.06$) compared to WT mice, our data evidenced that the P-gp gene and protein amounts were not significantly different between WT and 6 weeks ON p25 mice. Thus, the mechanism leading to this gain of P-gp function needs to be further investigated. For instance, it would be interesting to confirm the P-gp expression in WT and p25 mice by using another quantification technique such as Western blotting. It is also noteworthy that multiple post-translational modifications can modulate the P-gp activity, without changing its protein expression [66]. Such post-translational modifications include transporter trafficking [67], phosphorylation by the protein kinase C [68], [69], and specific association with other membrane proteins [70].

Interestingly, a decreased expression and function of P-gp in BBB vasculature has been found in normal aging [71]–[74] as well as in several neurodegenerative diseases, like Creutzfeldt–Jakob [75], Parkinson's diseases [76], [77] or AD patients [78], [79]. Similar tendency has been reported in 12-week-old Tg2576 mice, which develop the amyloid pathology only [80]. In 3xTgAD mice, which develop both, amyloid and pTau pathologies, the microvessels quantification of the P-gp was controversial. Indeed, Mehta et al. have reported a decrease of its expression, but without any modification of the BBB transport of three P-gp substrates in 18-20 months-age 3xTg-AD compared to WT mice (digoxin, loperamide and verapamil) [81]. On the contrary, we recently reported an increase of the P-gp expression in isolated brain microvessels of 18-months age 3xTg-AD mice brain microvessels, associated with a decrease of the A β efflux through the mouse BBB [30]. The P-gp has for long been thought to be the main BBB efflux pump and it has been suggested that P-gp could be involved in the BBB clearance of A β [82]–[84], although this

has been controversial [85], [86]. It is now known that the transport of A β through the BBB is a complex mechanism involving several receptors and transporters. Hence its influx is at least mediated by RAGE [87]–[89] and possibly Oatp1a4, as suggested by work conducted in mice by our group [90], whereas the efflux seems to be mediated by P-gp, BCRP [45], [47], [87], [91], Abcg4 [47], [48] and LRP1 [92]–[95]. *Lrp1* was up-regulated in p25 mice after 6 weeks ON, suggesting an increased A β cerebral clearance. On the contrary, LRP1 has been shown to be decreased at the BBB of AD patients [94], [96] and of old 3xTg-AD mice (18 months) [30]. There are at least two possible explanations for these discrepancies. First, we used qRT-PCR to explore the *Lrp1* gene expression at the BBB of p25 mice whereas other studies have measured the Lrp1 protein expression by western blot for 3xTg-AD [30] or immunohistochemistry for human studies [94]. Secondly, several studies have shown that LRP1 was co-localized with senile plaques [94], [97], [98] and it was hypothesized that BBB LRP1 decrease in AD could be directly related to A β toxicity [94]. Unlike AD patients and 3xTg-AD mice, p25 mice lack the amyloid (senile plaques) pathology, which could possibly explain why the decrease of Lrp1 is not observed at their BBB. Our data also showed that Oatp1a4 expression was not modified after up to 6 weeks ON, which is consistent with data obtained in 3xTg-AD mice [30]. To our knowledge, the BBB expression of OATP1A2, the human orthologue of Oatp1a4, has never been measured in AD patients. On the contrary, our results showed that *Ager* mRNA expression was up-regulated after 6 weeks ON. This is consistent with previous observations made in AD patients [94], [99]–[101]. However, unlike AD and most of the AD mouse models, p25 mice do not display brain A β accumulation before 8 weeks ON [36], suggesting that the increase of RAGE expression at the BBB level cannot be explained by the brain increase of its ligand, A β , as it had been previously suggested [101]–[104], but rather by ND and/or by pTau. Interestingly, a similar BBB increase of RAGE was observed in 3xTg-AD mice from 3 to 18 months-age, which display amyloid and pTau pathologies but not ND. The up-regulation of RAGE was shown to be the first change occurring in these mice [30]. Taken together, these data suggest that pTau could be a key point in terms of BBB

modifications. Supporting this hypothesis, we have recently shown that pTau might lead to neurovascular abnormalities [46]. Indeed, we observed a decrease of the cerebrovascular volume and an increase of the basement membrane thickness in the BBB of p25 and 3xTg-AD mice, which both display pTau [26], [35]. On the contrary, these BBB modifications were not observed in APP/PS1 mice, which develop only the amyloid pathology [26], [105]. Moreover, *in vitro* and *in vivo* studies have shown that pTau could cause damages in the BBB, such as a decrease of the transendothelial electrical resistance, *via* a pro-inflammatory cytokines release from microglia [106], [107]. Supporting this hypothesis, a relationships between pTau and a constriction of brain microvessels or decrease of cerebrovascular volume has been reported in two mouse models of neurodegeneration [108], [109]. In 3xTg-AD mice, we hypothesized that the increase of RAGE amount in brain microvessels was the first step to further BBB adaptation aiming at decreasing the brain accumulation of A β . Hence it was reported an early (3 months) increase of Abcg4 expression in brain microvessels, an increase of Abca1 from 3 to 18 months and a late increase of both, P-gp and Bcrp (18 months) [30]. Our current data also show an up-regulation of Abca1, Abca2, Abcg1, Abcg2 and Abcg4 after 6 weeks ON, suggesting an increase of the brain clearances of both, A β and cholesterol, in 6 weeks ON p25 mice. These results are also in agreement with results obtained in AD patients in which ABCA1, ABCG2 and ABCG4 were shown to be up-regulated [44], [45], [110], [111]. To our knowledge, ABCA2 and ABCG1 amounts have not been measured in AD patients nor in AD models yet. Similarly to 3xTg-AD mice in which Abca1 was the first ABC transporter to be modified from 3 months [30], Abca1 was the only ABC transporter to be up-regulated as from 3 weeks ON in p25 mice. These data show that ABCA1 is the first ABC transporter to be modified in p25 and 3xTgAD mice, suggesting that pTau might also be involved in this early BBB regulation. However, despite the up-regulation of all of its efflux transporters genes at the BBB (*Abca1*, *Abca2*, *Abcg1* and *Abcg4*), the brain uptake clearance of cholesterol was not modified in 6 weeks ON p25 mice, neither when cholesterol was perfused alone, nor when probucol (an inhibitor of Abca1 and Abcg4) was added to the perfusion fluid. It

may be hypothesized that other modulations, affecting the complex transport of cholesterol across the BBB, might have compensated the increase of its efflux transporters at the BBB level.

Collectively, the up-regulation of Lrp1, Abcg2, Abcg4 and the increased efflux capacity of the P-gp suggest an increase of the A β cerebral clearance in p25 mice after 6 weeks ON which might counterbalance the up-regulation of Rage, at this stage of the pathology. Nevertheless, an A β brain (intraneuronal) accumulation appears from 8 weeks ON in p25 mice [36], suggesting that, like Abcg4 in 3xTg-AD mice, the modulations of the A β efflux transporters are transient and that the increase of Rage finally leads to the brain accumulation of A β . This mechanism is also suggested in AD patients in which the cerebral A β clearance is 30% less efficient in AD brains, compared to normal brains [112], whereas the up-regulation of RAGE is maintained [94], [100], [101].

In conclusion, we have shown that p25 mice, a mouse model of severe ND associated with increased pTau, but no A β accumulation after 6 weeks ON, display profound functional modifications of their BBB. Indeed, the mRNA expression of Rage, implicated in A β influx, and of all ABC transporters involved in A β and cholesterol efflux at the BBB, except the P-gp, were up-regulated in p25 mice after 6 weeks ON. Moreover, the efflux transport capacity of the P-gp was increased in 6 weeks ON p25 mice, leading to a significant increase of the P-gp-mediated efflux of a CNS drug candidate, PKRinh. We suggest that, pTau, in addition to its role in neurovascular abnormalities, could contribute to BBB functional modifications in ND, and potentially in AD.

Acknowledgements

This work was supported by Paris Descartes University and SANOFI. We would like to thank Pr. Li-Huei Tsai for the accessibility of the CamKII-TetOp25 mouse model (p25 mice) and the Animal Platform, CRP2 - UMS 3612 CNRS - US25 Inserm - IRD – Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France, for taking care of animals. Confocal imaging was performed at the Cellular and Molecular Imaging facility of the Faculté de Pharmacie de Paris (Inserm US25, CNRS UMS 3612).

Disclosure/Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to report.

References

- [1] M. G. Erkinen, M.-O. Kim, and M. D. Geschwind, "Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, Jul. 2017.
- [2] D. E. Bredesen, R. V. Rao, and P. Mehlen, "Cell death in the nervous system," *Nature*, vol. 443, no. 7113, pp. 796–802, Oct. 2006.
- [3] M. S. Forman, J. Q. Trojanowski, and V. M.-Y. Lee, "Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs," *Nat. Med.*, vol. 10, no. 10, pp. 1055–1063, Oct. 2004.
- [4] J. P. Taylor, J. Hardy, and K. H. Fischbeck, "Toxic proteins in neurodegenerative disease," *Science*, vol. 296, no. 5575, pp. 1991–1995, Jun. 2002.
- [5] M. L. Block and J.-S. Hong, "Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism," *Prog. Neurobiol.*, vol. 76, no. 2, pp. 77–98, Jun. 2005.
- [6] M. T. Heneka *et al.*, "Neuroinflammation in Alzheimer's disease," *Lancet Neurol.*, vol. 14, no. 4, pp. 388–405, Apr. 2015.
- [7] M. P. Mattson, F. M. LaFerla, S. L. Chan, M. A. Leissring, P. N. Shepel, and J. D. Geiger, "Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders," *Trends Neurosci.*, vol. 23, no. 5, pp. 222–229, May 2000.
- [8] E. Popugaeva, E. Pchitskaya, and I. Bezprozvanny, "Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease – A therapeutic opportunity?," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 483, no. 4, pp. 998–1004, Feb. 2017.
- [9] S. Gandhi and A. Y. Abramov, "Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2012, p. 428010, 2012.
- [10] G. H. Kim, J. E. Kim, S. J. Rhie, and S. Yoon, "The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases," *Exp. Neurobiol.*, vol. 24, no. 4, pp. 325–340, Dec. 2015.
- [11] M. P. Mattson, "Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders," *Neuromolecular Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 65–94, 2003.
- [12] A. Mehta, M. Prabhakar, P. Kumar, R. Deshmukh, and P. L. Sharma, "Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 698, no. 1–3, pp. 6–18, Jan. 2013.
- [13] J. Fan, T. M. Dawson, and V. L. Dawson, "Cell Death Mechanisms of Neurodegeneration," *Adv. Neurobiol.*, vol. 15, pp. 403–425, 2017.
- [14] L. Buée, P. R. Hof, and A. Delacourte, "Brain Microvascular Changes in Alzheimer's Disease and Other Dementias," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 826, no. 1, pp. 7–24, Sep. 1997.
- [15] B. S. Desai, A. J. Monahan, P. M. Carvey, and B. Hendey, "Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy," *Cell Transplant.*, vol. 16, no. 3, pp. 285–299, 2007.
- [16] J. Drouin-Ouellet *et al.*, "Cerebrovascular and blood-brain barrier impairments in Huntington's disease: Potential implications for its pathophysiology," *Ann. Neurol.*, vol. 78, no. 2, pp. 160–177, Aug. 2015.

- [17] B. V. Zlokovic, "The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders," *Neuron*, vol. 57, no. 2, pp. 178–201, Jan. 2008.
- [18] N. J. Abbott, "Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation," *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 25, no. 1, pp. 5–23, Feb. 2005.
- [19] N. J. Abbott, L. Rönnebeck, and E. Hansson, "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, no. 1, pp. 41–53, Jan. 2006.
- [20] B. T. Hawkins and T. P. Davis, "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease," *Pharmacol. Rev.*, vol. 57, no. 2, pp. 173–185, Jun. 2005.
- [21] A. R. Nelson, M. D. Sweeney, A. P. Sagare, and B. V. Zlokovic, "Neurovascular Dysfunction and Neurodegeneration in Dementia and Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1862, no. 5, p. 887, May 2016.
- [22] A. Kumar, A. Singh, and null Ekavali, "A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update," *Pharmacol. Rep. PR*, vol. 67, no. 2, pp. 195–203, Apr. 2015.
- [23] M. A. Meraz-Ríos, K. I. Lira-De León, V. Campos-Peña, M. A. De Anda-Hernández, and R. Mena-López, "Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease," *J. Neurochem.*, vol. 112, no. 6, pp. 1353–1367, Mar. 2010.
- [24] T. C. Dickson and J. C. Vickers, "The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease," *Neuroscience*, vol. 105, no. 1, pp. 99–107, 2001.
- [25] G. G. Glenner and C. W. Wong, "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 120, no. 3, pp. 885–890, May 1984.
- [26] T. M. Do *et al.*, "Altered cerebral vascular volumes and solute transport at the blood-brain barriers of two transgenic mouse models of Alzheimer's disease," *Neuropharmacology*, vol. 81, pp. 311–317, Jun. 2014.
- [27] C. R. Hooijmans, C. Graven, P. J. Dederen, H. Tanila, T. van Groen, and A. J. Kiliaan, "Amyloid beta deposition is related to decreased glucose transporter-1 levels and hippocampal atrophy in brains of aged APP/PS1 mice," *Brain Res.*, vol. 1181, pp. 93–103, Nov. 2007.
- [28] A. M. Minogue, R. S. Jones, R. J. Kelly, C. L. McDonald, T. J. Connor, and M. A. Lynch, "Age-associated dysregulation of microglial activation is coupled with enhanced blood-brain barrier permeability and pathology in APP/PS1 mice," *Neurobiol. Aging*, vol. 35, no. 6, pp. 1442–1452, Jun. 2014.
- [29] F. Bourasset *et al.*, "Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease," *Neuropharmacology*, vol. 56, no. 4, pp. 808–813, Mar. 2009.
- [30] T. M. Do *et al.*, "Age-Dependent Regulation of the Blood-Brain Barrier Influx/Efflux Equilibrium of Amyloid- β Peptide in a Mouse Model of Alzheimer's Disease (3xTg-AD)," *J. Alzheimers Dis. JAD*, vol. 49, no. 2, pp. 287–300, 2016.
- [31] W. Alata, Y. Ye, I. St-Amour, M. Vandal, and F. Calon, "Human apolipoprotein E ϵ 4 expression impairs cerebral vascularization and blood-brain barrier function in mice," *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 35, no. 1, pp. 86–94, Jan. 2015.

- [32] J. C. Cruz, H.-C. Tseng, J. A. Goldman, H. Shih, and L.-H. Tsai, "Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles," *Neuron*, vol. 40, no. 3, pp. 471–483, Oct. 2003.
- [33] A. Brureau *et al.*, "NF-L in cerebrospinal fluid and serum is a biomarker of neuronal damage in an inducible mouse model of neurodegeneration," *Neurobiol. Dis.*, vol. 104, pp. 73–84, Aug. 2017.
- [34] A. Fischer, F. Sananbenesi, P. T. Pang, B. Lu, and L.-H. Tsai, "Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory," *Neuron*, vol. 48, no. 5, pp. 825–838, Dec. 2005.
- [35] C. Taccola *et al.*, "Modifications of physical and functional integrity of the blood-brain barrier in an inducible mouse model of neurodegeneration," in preparation.
- [36] J. C. Cruz *et al.*, "p25/Cyclin-Dependent Kinase 5 Induces Production and Intraneuronal Accumulation of Amyloid β In Vivo," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 41, pp. 10536–10541, Nov. 2006.
- [37] N. Horwood and D. C. Davies, "Immunolabelling of hippocampal microvessel glucose transporter protein is reduced in Alzheimer's disease," *Virchows Arch. Int. J. Pathol.*, vol. 425, no. 1, pp. 69–72, 1994.
- [38] R. N. Kalaria and S. I. Harik, "Reduced glucose transporter at the blood-brain barrier and in cerebral cortex in Alzheimer disease," *J. Neurochem.*, vol. 53, no. 4, pp. 1083–1088, Oct. 1989.
- [39] C. Iadecola, "The pathobiology of vascular dementia," *Neuron*, vol. 80, no. 4, pp. 844–866, Nov. 2013.
- [40] A. Montagne *et al.*, "Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus," *Neuron*, vol. 85, no. 2, pp. 296–302, Jan. 2015.
- [41] J. K. Ryu and J. G. McLarnon, "A leaky blood-brain barrier, fibrinogen infiltration and microglial reactivity in inflamed Alzheimer's disease brain," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 9A, pp. 2911–2925, Sep. 2009.
- [42] B. V. Zlokovic, "Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 12, no. 12, pp. 723–738, Nov. 2011.
- [43] B. V. Zlokovic, "Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration," *Trends Neurosci.*, vol. 28, no. 4, pp. 202–208, Apr. 2005.
- [44] Y. Uehara *et al.*, "ATP-binding cassette transporter G4 is highly expressed in microglia in Alzheimer's brain," *Brain Res.*, vol. 1217, pp. 239–246, Jun. 2008.
- [45] H. Xiong *et al.*, "ABCG2 is up-regulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for A β 1-40 peptides," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 29, no. 17, p. 5463, Apr. 2009.
- [46] C. Taccola *et al.*, "High brain distribution of a new central nervous system drug candidate despite its P-glycoprotein-mediated efflux at the mouse blood-brain barrier," in revision.
- [47] T. M. Do *et al.*, "ABCG2- and ABCG4-mediated efflux of amyloid- β peptide 1-40 at the mouse blood-brain barrier," *J. Alzheimers Dis. JAD*, vol. 30, no. 1, pp. 155–166, 2012.
- [48] A. Dodacki *et al.*, "Expression and function of Abcg4 in the mouse blood-brain barrier: role in restricting the brain entry of amyloid- β peptide," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 13393, Oct. 2017.

- [49] M. Mayford, M. E. Bach, Y. Y. Huang, L. Wang, R. D. Hawkins, and E. R. Kandel, "Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene," *Science*, vol. 274, no. 5293, pp. 1678–1683, Dec. 1996.
- [50] Y. Takasato, S. I. Rapoport, and Q. R. Smith, "An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat," *Am. J. Physiol.*, vol. 247, no. 3 Pt 2, pp. H484–493, Sep. 1984.
- [51] C. Dagenais, C. Rousselle, G. M. Pollack, and J. M. Scherrmann, "Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to mdr1a P-glycoprotein-deficient mice," *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 20, no. 2, pp. 381–386, Feb. 2000.
- [52] J. Cattelotte, P. André, M. Ouellet, F. Bourasset, J.-M. Scherrmann, and S. Cisternino, "In situ mouse carotid perfusion model: glucose and cholesterol transport in the eye and brain," *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 28, no. 8, pp. 1449–1459, Aug. 2008.
- [53] T. M. Do *et al.*, "Direct evidence of abca1-mediated efflux of cholesterol at the mouse blood-brain barrier," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 357, no. 1–2, pp. 397–404, Nov. 2011.
- [54] J. F. Oram and A. M. Vaughan, "ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 11, no. 3, pp. 253–260, Jun. 2000.
- [55] N. Wang *et al.*, "ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 22, no. 4, pp. 1073–1082, Apr. 2008.
- [56] N. Wang and A. R. Tall, "Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 23, no. 7, pp. 1178–1184, Jul. 2003.
- [57] E. Favari, I. Zanotti, F. Zimetti, N. Ronda, F. Bernini, and G. H. Rothblat, "Probucol inhibits ABCA1-mediated cellular lipid efflux," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 12, pp. 2345–2350, Dec. 2004.
- [58] Q. R. Smith, "Brain perfusion systems for studies of drug uptake and metabolism in the central nervous system," *Pharm. Biotechnol.*, vol. 8, pp. 285–307, 1996.
- [59] A. Avdeef and N. Sun, "A new in situ brain perfusion flow correction method for lipophilic drugs based on the pH-dependent Crone-Renkin equation," *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 3, pp. 517–530, Mar. 2011.
- [60] C. Dagenais, A. Avdeef, O. Tsinman, A. Dudley, and R. Beliveau, "P-Glycoprotein Deficient Mouse in situ Blood-Brain Barrier Permeability and its Prediction using an in combo PAMPA Model," *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.*, vol. 38, no. 2, p. 121, Sep. 2009.
- [61] S. Dauchy *et al.*, "ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood–brain barrier," *J. Neurochem.*, vol. 107, no. 6, pp. 1518–1528, Dec. 2008.
- [62] S. Yousif, C. Marie-Claire, F. Roux, J.-M. Scherrmann, and X. Declèves, "Expression of drug transporters at the blood-brain barrier using an optimized isolated rat brain microvessel strategy," *Brain Res.*, vol. 1134, no. 1, pp. 1–11, Feb. 2007.
- [63] C. Marie-Claire, C. Courtin, B. P. Roques, and F. Noble, "Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum," *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*, vol. 29, no. 12, pp. 2208–2215, Dec. 2004.

- [64] H. Volk, H. Potschka, and W. Löscher, "Immunohistochemical Localization of P-glycoprotein in Rat Brain and Detection of Its Increased Expression by Seizures Are Sensitive to Fixation and Staining Variables," *J. Histochem. Cytochem.*, Jun. 2016.
- [65] www.imagej.net, "ImageJ/Fiji [en ligne] <<https://imagej.net/Fiji>>, consulté le 24-10-2017." [Online]. Available: <https://imagej.net/Fiji>.
- [66] D. S. Miller, B. Bauer, and A. M. S. Hartz, "Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy," *Pharmacol. Rev.*, vol. 60, no. 2, pp. 196–209, Jun. 2008.
- [67] H. Kipp and I. M. Arias, "Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 64, pp. 595–608, 2002.
- [68] T. C. Chambers, I. Chalikonda, and G. Eilon, "Correlation of protein kinase C translocation, P-glycoprotein phosphorylation and reduced drug accumulation in multidrug resistant human KB cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 169, no. 1, pp. 253–259, May 1990.
- [69] C. W. Sachs, T. C. Chambers, and R. L. Fine, "Differential phosphorylation of sites in the linker region of P-glycoprotein by protein kinase C isozymes alpha, beta1, beta2, gamma, delta, epsilon, eta, and zeta," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 58, no. 10, pp. 1587–1592, Nov. 1999.
- [70] F. Schlachetzki and W. M. Pardridge, "P-glycoprotein and caveolin-1alpha in endothelium and astrocytes of primate brain," *Neuroreport*, vol. 14, no. 16, pp. 2041–2046, Nov. 2003.
- [71] G. D. Silverberg *et al.*, "Amyloid efflux transporter expression at the blood-brain barrier declines in normal aging," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 69, no. 10, pp. 1034–1043, Oct. 2010.
- [72] R. Toornvliet *et al.*, "Effect of age on functional P-glycoprotein in the blood-brain barrier measured by use of (R)-[(11)C]verapamil and positron emission tomography," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 79, no. 6, pp. 540–548, Jun. 2006.
- [73] S. Vogelgesang *et al.*, "The role of P-glycoprotein in cerebral amyloid angiopathy; implications for the early pathogenesis of Alzheimer's disease," *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 1, no. 2, pp. 121–125, May 2004.
- [74] S. Vogelgesang *et al.*, "Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans," *Pharmacogenetics*, vol. 12, no. 7, pp. 535–541, Oct. 2002.
- [75] S. Vogelgesang, M. Glatzel, L. C. Walker, H. K. Kroemer, A. Aguzzi, and R. W. Warzok, "Cerebrovascular P-glycoprotein expression is decreased in Creutzfeldt-Jakob disease," *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 111, no. 5, pp. 436–443, May 2006.
- [76] A. L. Bartels *et al.*, "Decreased blood-brain barrier P-glycoprotein function in the progression of Parkinson's disease, PSP and MSA," *J. Neural Transm.*, vol. 115, no. 7, pp. 1001–1009, Jul. 2008.
- [77] R. Kortekaas *et al.*, "Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo," *Ann. Neurol.*, vol. 57, no. 2, pp. 176–179, Feb. 2005.
- [78] D. M. E. van Assema *et al.*, "Blood-brain barrier P-glycoprotein function in Alzheimer's disease," *Brain J. Neurol.*, vol. 135, no. Pt 1, pp. 181–189, Jan. 2012.

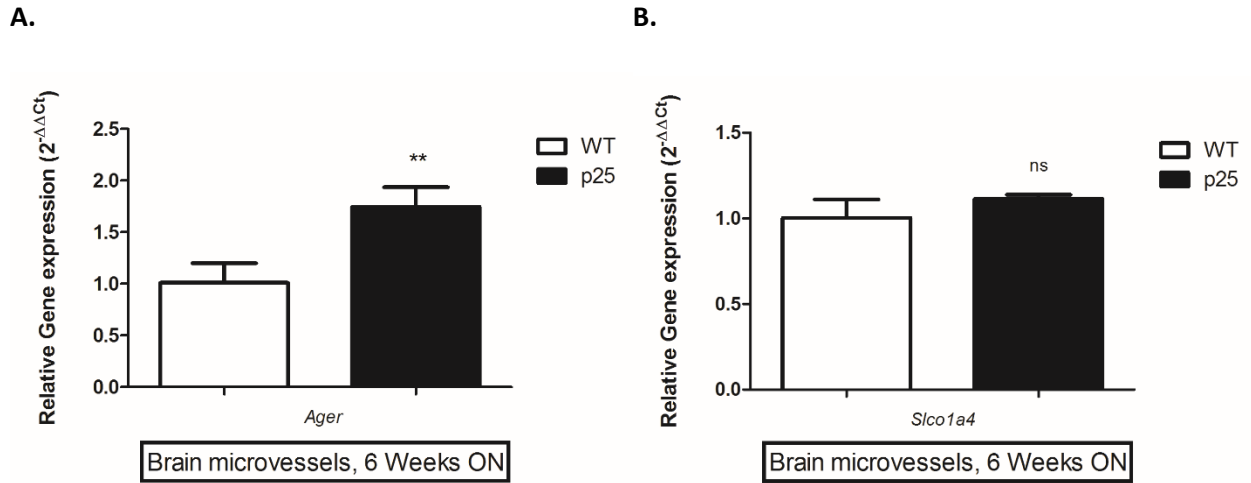
- [79] H. C. Wijesuriya, J. Y. Bullock, R. L. M. Faull, S. B. Hladky, and M. A. Barrand, "ABC efflux transporters in brain vasculature of Alzheimer's subjects," *Brain Res.*, vol. 1358, pp. 228–238, Oct. 2010.
- [80] A. M. S. Hartz, D. S. Miller, and B. Bauer, "Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease," *Mol. Pharmacol.*, vol. 77, no. 5, pp. 715–723, May 2010.
- [81] D. C. Mehta, J. L. Short, and J. A. Nicolazzo, "Altered brain uptake of therapeutics in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease," *Pharm. Res.*, vol. 30, no. 11, pp. 2868–2879, Nov. 2013.
- [82] J. R. Cirrito *et al.*, "P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 11, pp. 3285–3290, Nov. 2005.
- [83] D. Kuhnke *et al.*, "MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1) Mediates Transport of Alzheimer's amyloid-beta peptides—implications for the mechanisms of Abeta clearance at the blood-brain barrier," *Brain Pathol. Zurich Switz.*, vol. 17, no. 4, pp. 347–353, Oct. 2007.
- [84] F. C. Lam *et al.*, "beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein," *J. Neurochem.*, vol. 76, no. 4, pp. 1121–1128, Feb. 2001.
- [85] S. Ito, S. Ohtsuki, and T. Terasaki, "Functional characterization of the brain-to-blood efflux clearance of human amyloid-beta peptide (1-40) across the rat blood-brain barrier," *Neurosci. Res.*, vol. 56, no. 3, pp. 246–252, Nov. 2006.
- [86] B. Nazer, S. Hong, and D. J. Selkoe, "LRP promotes endocytosis and degradation, but not transcytosis, of the amyloid- β peptide in a blood-brain barrier in vitro model," *Neurobiol. Dis.*, vol. 30, no. 1, p. 94, Apr. 2008.
- [87] P. Candela *et al.*, "Apical-to-basolateral transport of amyloid- β peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein," *J. Alzheimers Dis. JAD*, vol. 22, no. 3, pp. 849–859, 2010.
- [88] R. Deane *et al.*, "RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain," *Nat. Med.*, vol. 9, no. 7, pp. 907–913, Jul. 2003.
- [89] J. B. Mackic *et al.*, "Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1- 40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer," *J. Clin. Invest.*, vol. 102, no. 4, pp. 734–743, Aug. 1998.
- [90] T. M. Do *et al.*, "Oatp1a4 and an L-thyroxine-sensitive transporter mediate the mouse blood-brain barrier transport of amyloid- β peptide," *J. Alzheimers Dis. JAD*, vol. 36, no. 3, pp. 555–561, 2013.
- [91] L. M. Tai, A. J. Loughlin, D. K. Male, and I. A. Romero, "P-glycoprotein and breast cancer resistance protein restrict apical-to-basolateral permeability of human brain endothelium to amyloid-beta," *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 29, no. 6, pp. 1079–1083, Jun. 2009.
- [92] R. D. Bell *et al.*, "Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system," *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 27, no. 5, pp. 909–918, May 2007.
- [93] R. Deane, R. D. Bell, A. Sagare, and B. V. Zlokovic, "Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease," *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, vol. 8, no. 1, pp. 16–30, Mar. 2009.

- [94] J. E. Donahue *et al.*, "RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease," *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 112, no. 4, pp. 405–415, Oct. 2006.
- [95] S. E. Storck *et al.*, "Endothelial LRP1 transports amyloid- β (1-42) across the blood-brain barrier," *J. Clin. Invest.*, vol. 126, no. 1, pp. 123–136, Jan. 2016.
- [96] M. Shibata *et al.*, "Clearance of Alzheimer's amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier," *J. Clin. Invest.*, vol. 106, no. 12, p. 1489, Dec. 2000.
- [97] G. W. Rebeck, J. S. Reiter, D. K. Strickland, and B. T. Hyman, "Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions," *Neuron*, vol. 11, no. 4, pp. 575–580, Oct. 1993.
- [98] I. Tooyama *et al.*, "Subcellular localization of the low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2-macroglobulin receptor) in human brain," *Brain Res.*, vol. 691, no. 1–2, pp. 235–238, Sep. 1995.
- [99] B. Jaynes and J. Provias, "Evidence for altered LRP/RAGE expression in Alzheimer lesion pathogenesis," *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 5, no. 5, pp. 432–437, Oct. 2008.
- [100] M. C. Miller *et al.*, "Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease," *Brain Res.*, vol. 1230, pp. 273–280, Sep. 2008.
- [101] S. D. Yan *et al.*, "RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease," *Nature*, vol. 382, no. 6593, pp. 685–691, Aug. 1996.
- [102] A. Bierhaus *et al.*, "Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products," *J. Mol. Med. Berl. Ger.*, vol. 83, no. 11, pp. 876–886, Nov. 2005.
- [103] A. Bierhaus and P. P. Nawroth, "Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications," *Diabetologia*, vol. 52, no. 11, pp. 2251–2263, Nov. 2009.
- [104] S. F. Yan, S. D. Yan, R. Ramasamy, and A. M. Schmidt, "Tempering the Wrath of RAGE: An Emerging Therapeutic Strategy Against Diabetic Complications, Neurodegeneration and Inflammation," *Ann. Med.*, vol. 41, no. 6, pp. 408–422, 2009.
- [105] J. F. Poduslo, G. L. Curran, T. M. Wengenack, B. Malester, and K. Duff, "Permeability of proteins at the blood-brain barrier in the normal adult mouse and double transgenic mouse model of Alzheimer's disease," *Neurobiol. Dis.*, vol. 8, no. 4, pp. 555–567, Aug. 2001.
- [106] L. J. Blair *et al.*, "Tau depletion prevents progressive blood-brain barrier damage in a mouse model of tauopathy," *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 3, Jan. 2015.
- [107] A. Kovac, M. Zilkova, M. A. Deli, N. Zilka, and M. Novak, "Human truncated tau is using a different mechanism from amyloid-beta to damage the blood-brain barrier," *J. Alzheimers Dis. JAD*, vol. 18, no. 4, pp. 897–906, 2009.
- [108] B. P. Head *et al.*, "Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging," *PloS One*, vol. 5, no. 12, p. e15697, Dec. 2010.
- [109] T. Jaworski *et al.*, "Dendritic degeneration, neurovascular defects, and inflammation precede neuronal loss in a mouse model for tau-mediated neurodegeneration," *Am. J. Pathol.*, vol. 179, no. 4, pp. 2001–2015, Oct. 2011.

- [110] A. Akram, J. Schmeidler, P. Katsel, P. R. Hof, and V. Haroutunian, "Increased expression of cholesterol transporter ABCA1 is highly correlated with severity of dementia in AD hippocampus," *Brain Res.*, vol. 1318C, p. 167, Mar. 2010.
- [111] W. S. Kim *et al.*, "Increased ATP-binding cassette transporter A1 expression in Alzheimer's disease hippocampal neurons," *J. Alzheimers Dis. JAD*, vol. 21, no. 1, pp. 193–205, 2010.
- [112] K. G. Mawuenyega *et al.*, "Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease," *Science*, vol. 330, no. 6012, p. 1774, Dec. 2010.

Figures

Fig. 1. Gene expression of Rage and Oatp1a4 influx transporters at the blood brain barrier of p25 mice.



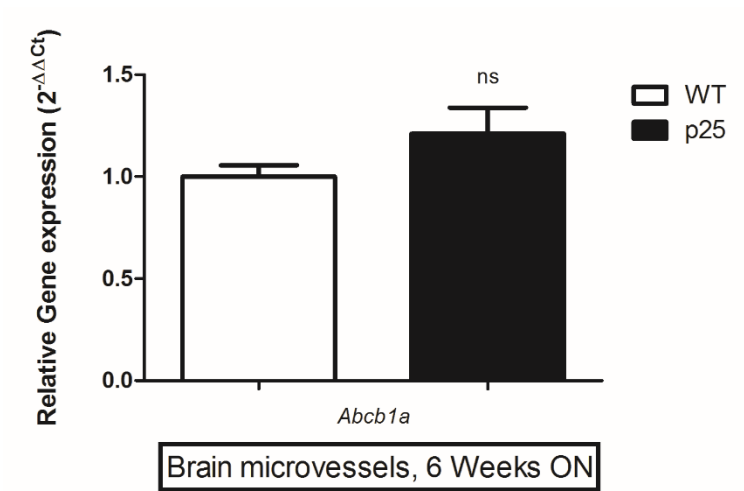
mRNA levels of the genes coding for Rage (*Ager*) **(A)** and Oatp1a4 (*Slco1a4*) **(B)** influx transporters were determined by qRT-PCR on WT and p25 brain isolated microvessels after 6 weeks ON. Data presented are normalized to β -actin and analyzed using the comparative Ct method ($\Delta\Delta Ct$) to calculate relative gene expression. A t-test was used to identify significant differences between p25 and WT mice for each gene.

N = 3 pools of 4-6 mouse brains each.

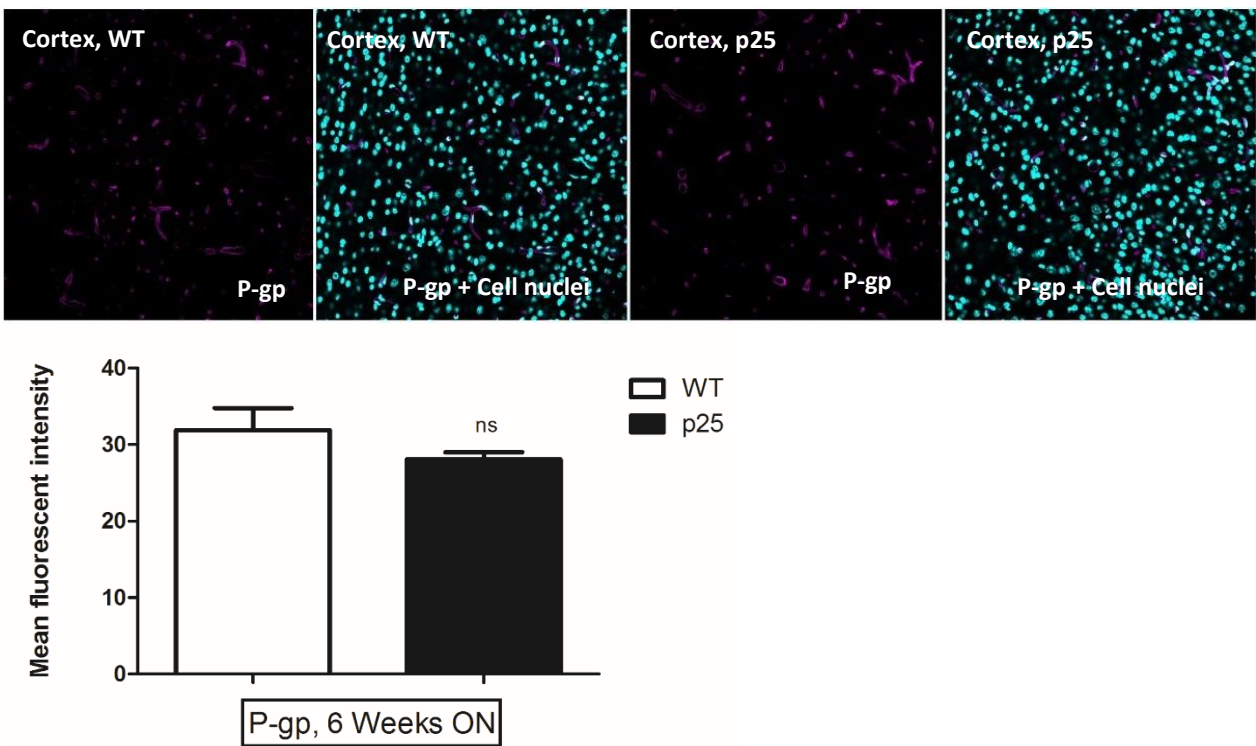
ns = not significant, **p< 0.01.

Fig. 2. P-gp expression and function at the blood brain barrier of p25 mice.

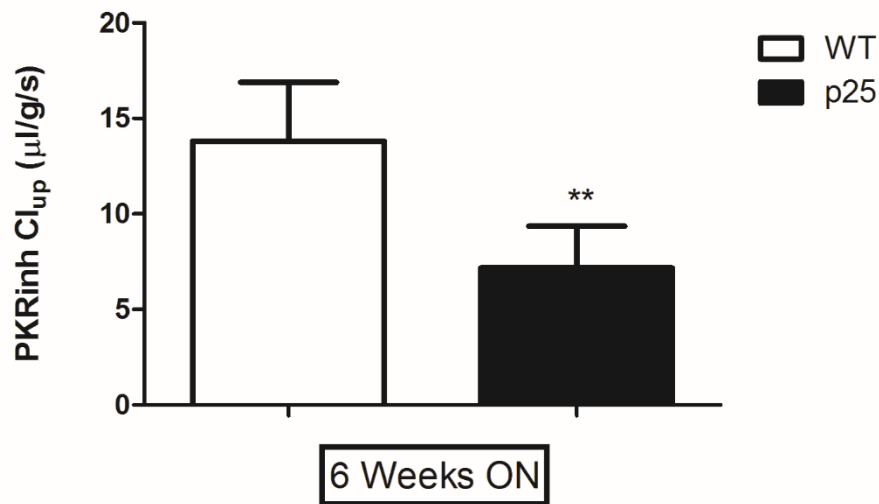
A.



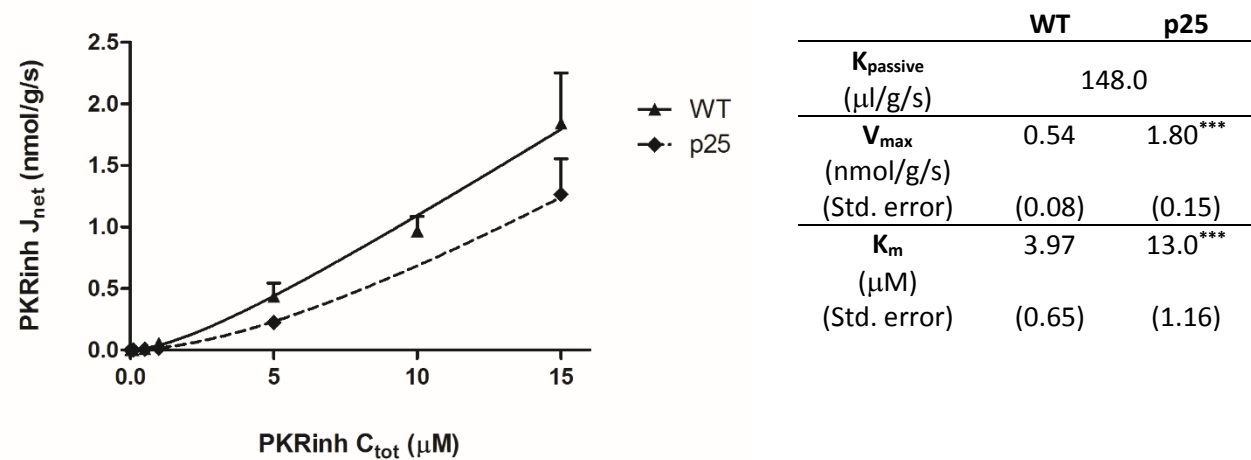
B.



C.



D.



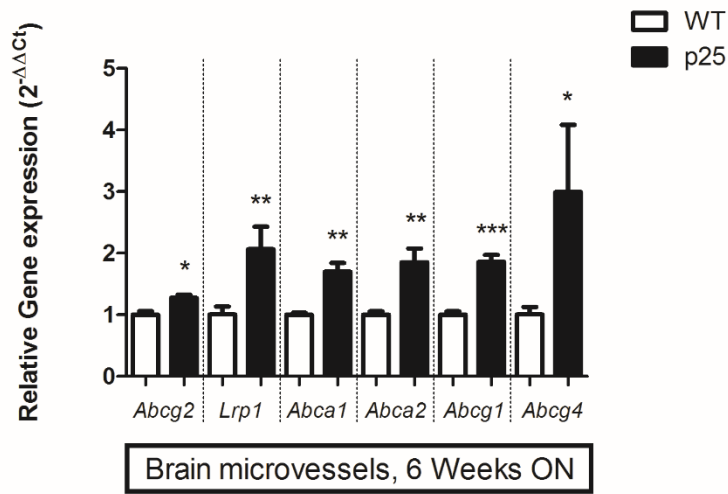
(A) mRNA level of the gene coding for the P-gp transporter (*Abcb1a*) was determined by qRT-PCR on WT and p25 brain isolated microvessels after 6 weeks ON. Data presented are normalized to β -actin and analyzed using the comparative Ct method ($\Delta\Delta C_t$) to calculate relative gene expression. A t-test was used to identify significant differences. N = 3 pools of 4-6 mouse brains each. **(B)** The P-gp protein expression at the BBB was determined by immunofluorescence microscopy, using anti-P-gp antibodies (magenta) on

coronal brain sections (50 μm) of WT and p25 mice after 6 weeks ON. Cell nuclei were counterstained with TOPRO-3 (cyan). Data represent the mean $\pm$ SD and were analyzed using a linear mixed model on log-transformed values. N = 3 mice (12 images per mouse). **(C)** The diffusion of the P-gp substrate [^3H]-PKRinh through the blood-brain barrier of WT and p25 mice after 6 weeks ON was measured by *in situ* brain perfusion. A t-test was used to identify significant differences. N = 5 mice. **(D)** Total [^3H]-PKRinh brain flux (J_{net} ; nmol/g/s) was measured by *in situ* brain perfusion in the mouse right hemisphere of WT (solid line) and p25 mice (dotted line) after 6 weeks ON and fitted to total (radiolabeled and unlabeled) PKRinh concentration in Krebs-carbonate perfusion fluid (C_{tot} ; $\mu\text{mol/l}$) by non-linear regression. K_{passive} was fixed at 148.0 $\mu\text{l/g/s}$ for WT and p25 mice. The estimated parameters for PKRinh BBB transport are for WT mice: $V_{\text{max}} = 0.54 \pm 0.08$ nmol/g/s, $K_m = 3.97 \pm 0.65$ μM and for p25 mice: $V_{\text{max}} = 1.80 \pm 0.15$ nmol/g/s, $K_m = 13.0 \pm 1.16$ μM .

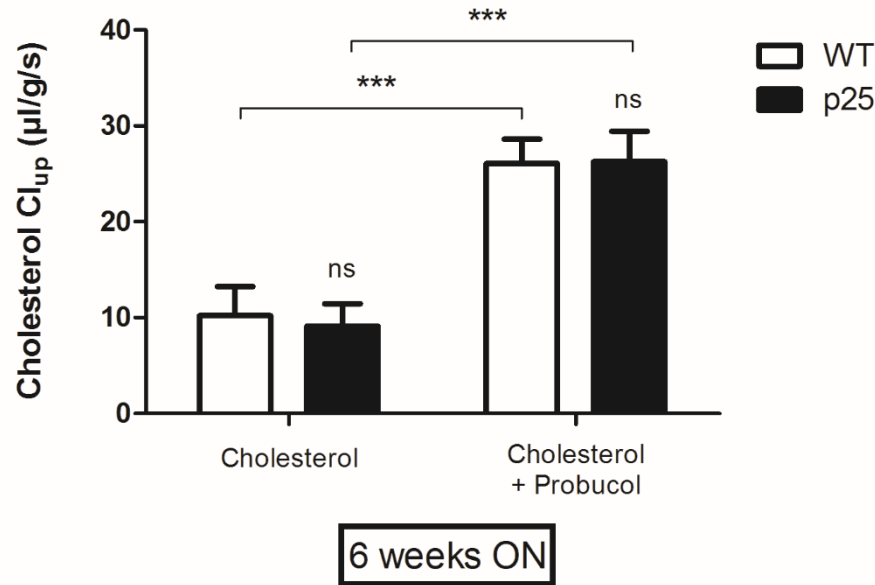
ns = not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

Fig. 3. Gene expression and function of sterols efflux transporters at the blood brain barrier of p25 mice.

A.



B.



(A) mRNA levels of the genes coding for Bcrp, *Lrp1*, *Abca1*, *Abca2*, *Abcg1* and *Abcg4* efflux transporters (transporters (*Abcg2*, *Lrp1*, *Abca1*, *Abca2*, *Abcg1* and *Abcg4*, respectively) were determined by qRT-PCR

on WT and p25 brain isolated microvessels after 6 weeks ON. Data presented are normalized to β -actin and analyzed using the comparative Ct method ($\Delta\Delta$ Ct) to calculate relative gene expression. A t-test was used to identify significant differences. N = 3 pools of 4-6 mouse brains each. **(B)** The diffusion of [^{3} H]-Cholesterol through the blood-brain barrier of WT and p25 mice after 6 weeks ON was measured by *in situ* brain perfusion with and without Probucol (10 μ M), a Abca1 and Abcg4 inhibitor. A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-test was used to identify significant differences. N = 5-6 mice.

ns = not significant, *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001.

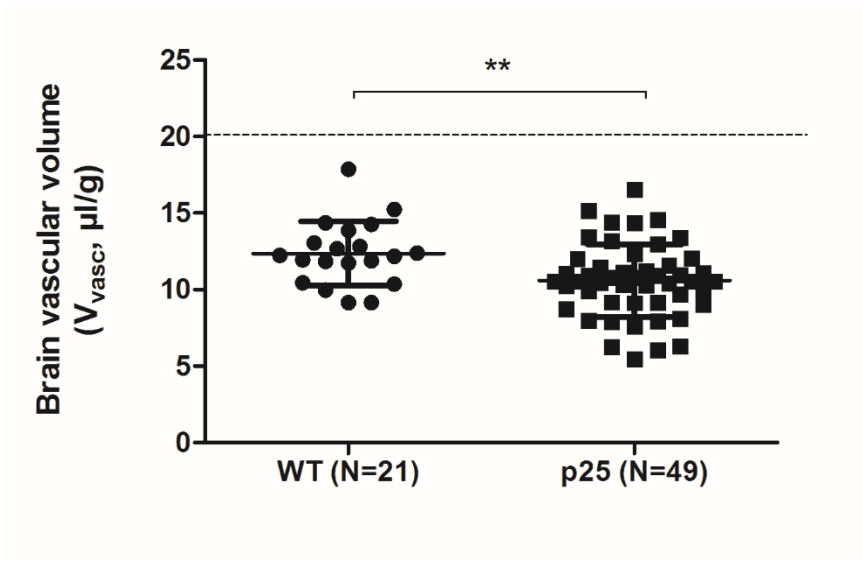
Tables

Table 1. Primers sequences used for qRT-PCR assay

Gene	Protein	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Length (bp)
<i>Slco1a4</i>	Oatp1a4	TGGCCCTTTGATTGGACTTCTG	ACCGACCCAGCGTGTATCAG	114
<i>Abca1</i>	Abca1	AGCTGGGAAGTCAACAACCTTCA	GCCCATGTTCTGGTGTACTTCAT	120
<i>Abca2</i>	Abca2	ACCAGCAACCCAAAATCCT	ACCTGGGCGTAGTGTGTAACG	112
<i>Abcb1a</i>	Abcb1 (P-gp)	AAGCGACTCCGATACATGGTTT	AGTGCTCCGGTGGTGTITTTAGG	85
<i>Abcg1</i>	Abcg1	GCTGCCTCACCTCACTGTTC	CTCTCGTCTGCCTTCATCCTTC	81
<i>Abcg2</i>	Abcg2 (Bcbrp)	TGGCTGTCCTGGCTTCAGTAC	AGTGCTGTTGTCCGTTACATTGA	116
<i>Abcg4</i>	Abcg4	CGCTCTGCTGTGGACATCG	CTCGGCGACAGAACTTACCAG	119
<i>Lrp1</i>	Lrp1	CCGCCCCCTCCTACCACT	CGGCCACCCAGTCGATAGC	113
<i>Ager</i>	Rage	GCGAGGGAAGGAGGTCAAGTC	ACACTGGCTGTGAGTTCAGAGG	98

Supplementary Data

Supplementary Figure 1. Brain vascular volumes (V_{vasc} , $\mu\text{l/g}$) in WT and p25 mice



A t-test was used to identify significant differences (** = $P < 0.01$)

DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse s'est intéressé aux modèles murins transgéniques permettant de mimer certains aspects de la MA. Il apporte des informations sur l'intégrité physique et fonctionnelle de la BHE dans un contexte de ND grâce au modèle p25. Nous allons donc discuter des modifications de la BHE observées chez les souris p25, en regard des modifications ayant été décrites dans les différents modèles murins utilisés dans la MA ainsi que chez l'Homme. Enfin, nous discuterons de l'impact de ces modifications sur la neuropharmacocinétique des composés endogènes mais aussi exogènes en prenant comme exemple PKRinh, un inhibiteur sélectif de l'activation de PKR, développé par le laboratoire Sanofi dans la ND.

❖ Intégrité de l'arbre vasculaire et perméabilité de la barrière hémato-encéphalique dans la neurodégénérescence et la maladie d'Alzheimer

L'existence de dysfonctions cérébrovasculaires dans les maladies ND, et plus particulièrement dans la MA, est connue depuis longtemps (Claudio, 1996; Heyman et al., 1998; Scheibel et al., 1989; Wisniewski and Kozlowski, 1982). Le fait que ces dysfonctions soient la cause ou la conséquence de la pathologie n'est cependant pas clairement élucidé. Récemment, Zlokovic et collaborateurs ont développé une « hypothèse neurovasculaire » de la MA (voir partie II) C.4. L'hypothèse neurovasculaire de la maladie d'Alzheimer), qui place la BHE au cœur de la pathogénèse de cette pathologie (Zlokovic, 2011). En effet, celle-ci propose que des lésions vasculaires, incluant la rupture de la perméabilité de la BHE et l'altération de la vascularisation du parenchyme cérébral, constituent l'élément initial de la cascade pathologique conduisant aux dysfonctions synaptiques, aux lésions neuronales et à la ND dans la MA (Nelson et al., 2016; Sagare et al., 2013; Zlokovic, 2011).

- Perméabilité de la BHE

L'hypothèse neurovasculaire suggère que la BHE est ouverte de façon précoce dans la MA, permettant l'entrée massive dans le SNC de peptide A β circulant, dont la concentration plasmatique est élevée dans la MA (Matsubara et al., 1999), mais aussi de molécules neurotoxiques circulantes, comme la thrombine, le plasminogène ou encore le fibrinogène (Halliday et al., 2016; Hultman et al., 2013; Zipser et al., 2007), ce qui entraînerait des lésions neuronales et synaptiques et à terme la mort neuronale dans la MA

(Nelson et al., 2016; Sagare et al., 2013; Zlokovic, 2011). Cependant, l'ouverture de la BHE chez les patients atteints de la MA reste controversée et l'ensemble des études ayant utilisé la PCIS pour étudier la perméabilité de la BHE dans les modèles animaux mimant certains aspects de la MA ont montré que celle-ci n'était pas altérée. L'intégrité physique de la BHE a été retrouvée intacte dans deux modèles murins exprimant des mutations humaines de la forme familiale de la MA, à savoir les souris APP/PS1 à 8 mois (Do et al., 2014) et 3xTg-AD entre 3 et 18 mois (Bourasset et al., 2009; Do et al., 2014) ainsi que chez les souris p25, un modèle de ND sévère (avec hyperphosphorylation de Tau à 6 semaines) (Cruz et al., 2003, 2006; Fischer et al., 2005), après 3 et 6 semaines d'induction ([Article 1](#)) et enfin dans un modèle de MA sporadique exprimant le principal facteur de risque génétique de la MA (souris APOE4 entre 2 et 12 mois) (Alata et al., 2015). Il est intéressant de noter que certaines études réalisées chez des souris ne présentant que la pathologie amyloïde (mutation de l'APP et/ou des enzymes de la voie amyloïdogénique), ont montré des résultats différents. En effet, Minogue et collaborateurs ont montré, par IRM, que la perméabilité de la BHE était augmentée chez les souris APP/PS1 âgées de 14 et 24 mois (Minogue et al., 2014), et Paul et collaborateurs ont utilisé le colorant bleu Evans pour mettre en évidence une augmentation de la perméabilité de la BHE chez les souris Tg2576, PDAPP et TgCRND8 âgées de 6 et 12 mois (Paul et al., 2007). Au-delà du fait que ces techniques sont différentes de la PCIS, et donc difficilement comparables, ces deux études ont utilisé des animaux globalement plus âgés, pour lesquels les lésions neuropathologiques sont plus avancées que dans les études de PCIS. En effet, chez les souris APP/PS1, les plaques séniles sont déjà présentes avant 8 mois et chez les souris simple transgéniques, elles apparaissent entre 3 et 9 mois (voir partie I) [C.4. Bilan des modèles murins transgéniques utilisés dans la maladie d'Alzheimer](#)). Enfin, Ujje et collaborateurs ont également mis en évidence une altération de la perméabilité de la BHE chez les souris Tg2576 âgées de 4 à 18 mois grâce au colorant bleu Evans (Ujje et al., 2003). Cependant, la méthodologie de l'analyse statistique pose question, une différence statistique de perméabilité entre les souris Tg2576 et leurs contrôles ayant été déclarée avec une valeur de $p = 0.07$.

Le même phénomène a été mis en évidence chez l'Homme : les études ayant exploré la perméabilité de la BHE chez l'Homme dans la MA présentent des différences en termes de méthodologie, de stade de la pathologie et de résultats. En effet, toutes les études *in vivo* ayant utilisé des techniques d'imagerie médicale, telles que la tomodensitométrie, l'imagerie TEP ou l'IRM, chez des patients remplissant les critères d'une « MA probable » n'ont pas mis en évidence d'ouverture de la BHE chez leurs patients (Bronge and Wahlund, 2000; Caserta et al., 1998; Dysken et al., 1990; Schlageter et al., 1987; Starr et al., 2009; Wang et al., 2006). En revanche, toutes les études *post-mortem* ayant utilisé des techniques

histopathologiques, telles que le marquage cérébral par IHC de l'albumine, préalbumine, d'immunoglobulines ou encore du fibrinogène, ont conclu à une altération de l'intégrité physique de la BHE (Alafuzoff et al., 1983; Berzin et al., 2000; Blennow et al., 1990; Zipser et al., 2007). Il paraît évident que les patients décédés sélectionnés pour ces études, et dont le diagnostic de MA sévère a pu être posé avec certitude en *post-mortem*, devaient présenter un stade plus avancé de la pathologie que ceux inclus dans les études d'imagerie médicale. De plus, le diagnostic définitif de la MA ne pouvant être posé que par examen du tissu cérébral, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les études d'imagerie aient inclus des patients atteints d'une autre démence ou de MCI.

Enfin, nous avons montré, par qRT-PCR, qu'il ne semblait pas y avoir de régulation négative des gènes codant pour les protéines des jonctions serrées à la BHE, dans le modèle p25 ([Article 1](#)). Au contraire, le gène codant pour la protéine ZO-1 (*Tjp1*) est positivement régulé chez les souris p25 après 6 semaines d'induction ([Article 1](#)), ce qui est en faveur d'une diminution de la perméabilité de la BHE chez ces souris. Autrement dit, cette régulation pourrait participer à la conservation d'une BHE intacte après 6 semaines d'induction. Ces résultats sont en accord avec l'absence d'altération de l'intégrité physique de la BHE pour ce modèle ([Article 1](#)). Nous ne pouvons cependant pas affirmer avec certitude que les protéines des jonctions serrées sont bien exprimées et fonctionnelles entre les CECCs chez ces souris. Il est intéressant de noter que dans un contexte de pathologie amyloïde, les résultats sont tout autres, montrant au contraire une diminution de l'expression ainsi que des anomalies dans l'organisation et la morphologie des protéines des jonctions serrées à la BHE (Biron et al., 2011; Kook et al., 2012, 2013; Takechi et al., 2008). Malheureusement, aucune étude de ce type n'a été réalisée chez l'Homme pour confirmer ces observations, les techniques d'imagerie actuelles n'ayant pas la résolution suffisante pour imager directement les jonctions serrées à la BHE humaine (Erickson and Banks, 2013; Luissint et al., 2012a).

Collectivement, l'ensemble des données disponibles dans la littérature portant sur la perméabilité de la BHE dans les modèles murins utilisés dans la MA, ainsi que les données que nous avons obtenues dans le modèle p25 ([Tableau 5](#) et [Figure 3](#)), ne soutiennent pas l'hypothèse d'une ouverture précoce et massive de la BHE dans la ND et la MA, comme suggéré par l'hypothèse neurovasculaire. En effet, les modèles murins ont montré que l'intégrité physique de la BHE était intacte, ou bien tardivement altérée. Ainsi, l'ouverture de la BHE pourrait intervenir en aval dans la pathogénèse de la MA dont elle serait l'une des conséquences, plutôt que l'origine. Ceci semble être en accord avec les observations réalisées chez les patients atteints de la MA. L'entrée massive de peptide A β circulant ou de molécules neurotoxiques du fait d'une BHE ouverte ne semble donc pas être la première étape de la pathogénèse de la MA.

- *Altération de la vascularisation du parenchyme cérébral*

Chez l'Homme, une altération de la vascularisation du parenchyme cérébral dans la MA a été mise en évidence par de nombreuses études (Iadecola, 2013; Roher et al., 2012; Zlokovic, 2011) et ce, dès le stade précoce et asymptomatique de la pathologie (Ruitenberg et al., 2005). Celle-ci pourrait provenir de la combinaison de plusieurs phénomènes tels que la diminution du flux vasculaire cérébral (Binnewijzend et al., 2016; Chao et al., 2010; Johnson et al., 2005), l'épaississement de la lame basale des microvaisseaux (Claudio, 1996; Kalaria and Pax, 1995; Mancardi et al., 1980; Zarow et al., 1997) ou encore la diminution de la densité vasculaire (Brown et al., 2007; Buée et al., 1994; Fischer et al., 1990) et pourrait contribuer à un hypométabolisme du glucose et une hypoxie des tissus cérébraux chez ces patients (Chen and Zhong, 2013; van de Haar et al., 2015; Zlokovic, 2011). Ainsi, l'altération de la vascularisation cérébrale contribuerait à la ND et à la diminution des performances cognitives chez les patients atteints de la MA.

Des travaux de PCIS, réalisés par notre équipe, ont montré que le volume vasculaire était significativement diminué chez les souris 3xTg-AD (Bourasset et al., 2009; Do et al., 2014) et p25 après 6 semaines d'induction ([Article 1](#)). Par ailleurs, ces souris présentent une augmentation du collagène IV dans la paroi de leurs microvaisseaux (Bourasset et al., 2009; González-Marrero et al., 2015, [Article 1](#)) et ceci est accompagné d'un épaississement de la lame basale entourant les CECCs chez les souris 3xTg-AD (Bourasset et al., 2009). Une augmentation du collagène IV dans les microvaisseaux cérébraux a également été observée chez le sujet âgé (Brown and Thore, 2011; Farkas et al., 2006), et ce phénomène est exacerbé chez les patients atteints de la MA (Claudio, 1996; Kalaria, 1992; Kalaria and Pax, 1995; Mancardi et al., 1980; Yamashita et al., 1991; Zarow et al., 1997). Chez l'Homme, l'imagerie confocale a montré que cet épaississement de la lame basale des CECCs provoque une diminution de la lumière des vaisseaux (Uspenskaia et al., 2004). Ainsi, une diminution de la lumière des microvaisseaux résultant de l'accumulation de collagène IV dans leur paroi, associée à l'augmentation de l'expression de *Tjp1* (pour les souris p25), pourrait expliquer la réduction du volume vasculaire observé chez les souris 3xTg-AD et p25. En nuisant aux mécanismes de transport cérébral des nutriments et des électrolytes, mais aussi à l'élimination du peptide A β et au bon fonctionnement neuronal, l'épaississement de la lame basale pourrait être un élément clé de la pathogénèse de la MA (Farkas and Luiten, 2001). En revanche, la PCIS n'a révélé aucune diminution du volume vasculaire chez les souris APP/PS1 (Do et al., 2014; Poduslo et al., 2001). Ces souris ne développent que la pathologie amyloïde alors que les souris 3xTg-AD développent la pathologie amyloïde et Tau (voir partie I) [C.3. Modèles transgéniques de la maladie](#)

d'Alzheimer). Do et collaborateurs ont alors émis l'hypothèse que la protéine Tau hyperphosphorylée joue un rôle important dans la régulation de la morphologie de la BHE au cours de la MA (Do et al., 2014). Nos travaux portant sur les souris p25 qui présentent une hyperphosphorylation de Tau à 6 semaines d'induction et une ND sévère, mais pas de plaques amyloïdes, et dont le volume vasculaire cérébral est diminué à 6 semaines ([Article 1](#)), renforcent cette hypothèse. De même, deux études portant sur des modèles murins de ND associée à une pathologie Tau ont montré une constriction des microvaisseaux cérébraux et une diminution du volume vasculaire cérébral (Head et al., 2010; Jaworski et al., 2011).

Chez le rongeur, il est possible d'évaluer la surface d'échange entre le sang et le parenchyme cérébral en mesurant la clairance d'entrée cérébrale du diazépam par PCIS. En effet, le diazépam traverse la BHE par diffusion passive, un processus qui ne nécessite ni implication d'un transporteur, ni consommation d'énergie. Selon la loi de Fick, la capacité d'une molécule lipophile, comme le diazépam, à traverser la BHE dépend à la fois de la surface d'échange et de la vitesse de perfusion (Dagenais et al., 2000). Puisque la vitesse de perfusion est imposée et contrôlée durant la PCIS, la clairance d'entrée cérébrale du diazépam ne dépend que de la surface de la vascularisation (Alata et al., 2015; Bourasset et al., 2009). Grâce à cette technique, il a été montré que la surface de la BHE n'était pas modifiée chez les souris APP/PS1 (Do et al., 2014), 3xTg-AD (Bourasset et al., 2009; Do et al., 2014) et p25, quelle que soit la durée de l'induction ([Article 1](#)), ce qui suggère un maintien de la vascularisation cérébrale dans ces modèles. Ceci est d'autant plus intéressant chez les souris p25 qui présentent une atrophie cérébrale importante (Brureau et al., 2017; Cruz et al., 2003; Fischer et al., 2005, [Article 1](#)), contrairement aux autres modèles murins utilisés dans la MA (Hooijmans et al., 2007a; Oakley et al., 2006; Oddo et al., 2003b, 2003a; Radde et al., 2006; Savonenko et al., 2005). En effet, dans ce modèle de ND, nous avons montré, en accord avec la littérature (Brureau et al., 2017; Cruz et al., 2003), que le poids du cerveau était significativement diminué dès 3 semaines d'induction et atteignait - 30% après 6 semaines d'induction ([Article 1](#)). Chez ces souris, l'atrophie cérébrale, induite par la mort neuronale, ne s'accompagne pas d'une atrophie des microvaisseaux cérébraux ([Article 1](#)). Ceci suggère que l'atrophie vasculaire observée chez les patients atteints de la MA (Brown et al., 2007; Buée et al., 1994; Fischer et al., 1990) pourrait être induite par un élément pathologique non reproduit par les modèles murins de pathologie amyloïde et/ou Tau, ni par les modèles de ND. Par ailleurs, les souris APOE4, qui miment la forme sporadique de la MA en exprimant le principal facteur de risque génétique de la maladie (*APOE ε4*), présentent une diminution de la surface de leur BHE (Alata et al., 2015). Cela suggère que l'atrophie vasculaire pourrait être spécifique des formes sporadiques de la MA, et possiblement liée à l'altération

du métabolisme du cholestérol *via* l'*APOE ε4*, d'autant plus que celui-ci est également un facteur de risque de la CAA (Bu, 2009). Enfin, les souris APOE4 semblent présenter des altérations morphologiques des microvaisseaux cérébraux différentes des souris 3xTg-AD et p25 avec un volume vasculaire inchangé et une diminution du collagène IV dans la paroi de leurs microvaisseaux cérébraux (Alata et al., 2015), ce qui renforce l'idée de l'importance du type de maladie modélisée (forme familiale ou sporadique de la MA) dans les altérations neurovasculaires retrouvées chez les différents modèles murins.

Collectivement, l'ensemble des données disponibles dans la littérature portant sur les dysfonctions vasculaires dans les modèles murins utilisés dans la MA, ainsi que les données que nous avons obtenues dans le modèle p25 (**Tableau 5** et **Figure 3**), suggèrent une altération morphologique importante des microvaisseaux cérébraux dans la ND et la MA. En revanche, les modèles développant la pathologie amyloïde et/ou Tau ainsi que le modèle p25 combinant la ND et la pathologie Tau ne présentent aucune altération de la surface de la BHE, contrairement aux patients atteints de la MA et aux souris APOE4. Nous savons qu'aucun modèle murin ne peut reproduire intégralement la pathologie humaine puisqu'ils ne reproduisent qu'un aspect particulier de la pathologie. Le choix du modèle murin est donc particulièrement important puisque l'altération de l'arbre vasculaire cérébral semble fortement dépendre de la pathologie développée par le modèle.

Modulations de la BHE	Modèles murins transgéniques				Homme
	Tg2576, PDAPP, TgCRND8, 5xFAD & APP/PS1	3xTg-AD	p25	APOE4	
	Plaques Amyloïdes	Hyperphosphorylation de Tau + Plaques Amyloïdes	Hyperphosphorylation de Tau (6 semaines) + Neurodégénérescence	Altération du métabolisme du Cholestérol	
Intégrité physique					
Jonctions serrées	↘ ou anormales Chez Tg2576, 5xFAD & APP/PS1 (IHC) (Biron et al., 2011; Kook et al., 2012, 2013; Takechi et al., 2008)	-	↗ ou ↔ ARNm (qRT-PCR) (Article 1)	-	-
Perméabilité de la BHE	↗ Chez Tg2576, PDAPP, TgCRND8 & APP/PS1 (24 mois) (bleu Evans, Imagerie) (Minogue et al., 2014; Paul et al., 2007; Ujiie et al., 2003) ou ↔ Chez APP/PS1 (PCIS, [3H]-saccharose) (Do et al., 2014; Poduslo et al., 2001)	↔ (PCIS, [3H]-saccharose) (Bourasset et al., 2009; Do et al., 2014)	↔ (PCIS, [3H]-saccharose) (Article 1)	↔ (PCIS, [3H]-saccharose) (Alata et al., 2015)	↗ (IHC) (Alafuzoff et al., 1983; Berzin et al., 2000; Blennow et al., 1990; Zipser et al., 2007) ou ↔ (Imagerie) (Bronge and Wahlund, 2000; Caserta et al., 1998; Dysken et al., 1990; Schlageter et al., 1987; Starr et al., 2009; Wang et al., 2006)
Dysfonctions vasculaires					
Volume vasculaire	↔ Chez APP/PS1 (PCIS, [3H]-saccharose) (Do et al., 2014; Poduslo et al., 2001)	↘ (PCIS, [3H]-saccharose) (Bourasset et al., 2009; Do et al., 2014)	↘ (PCIS, [3H]-saccharose) (Article 1)	↔ (PCIS, [3H]-saccharose) (Alata et al., 2015)	-
Epaisseur de la lame basale	-	↗ (IHC, collagène IV) (Bourasset et al., 2009; González-Marrero et al., 2015)	↗ (IHC, collagène IV) (Article 1)	↘ (IHC, collagène IV) (Alata et al., 2015)	↗ (microscopie électronique, marquage du collagène IV) (Claudio, 1996; Kalaria, 1992; Kalaria and Pax, 1995; Mancardi et al., 1980; Yamashita et al., 1991; Zarow et al., 1997)
Surface de la BHE	↔ Chez APP/PS1 (PCIS, [3H]-diazépam) (Do et al., 2014)	↔ (PCIS, [3H]-diazépam) (Bourasset et al., 2009; Do et al., 2014)	↔ (PCIS, [3H]-diazépam) (Article 1)	↘ (PCIS, [3H]-diazépam) (Alata et al., 2015)	-

Tableau 5 : Tableau comparatif des dysfonctions vasculaires et de l'intégrité physique de la barrière hémato-encéphalique chez différents modèles murins transgéniques reproduisant certains aspects de la maladie d'Alzheimer ainsi que chez le patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

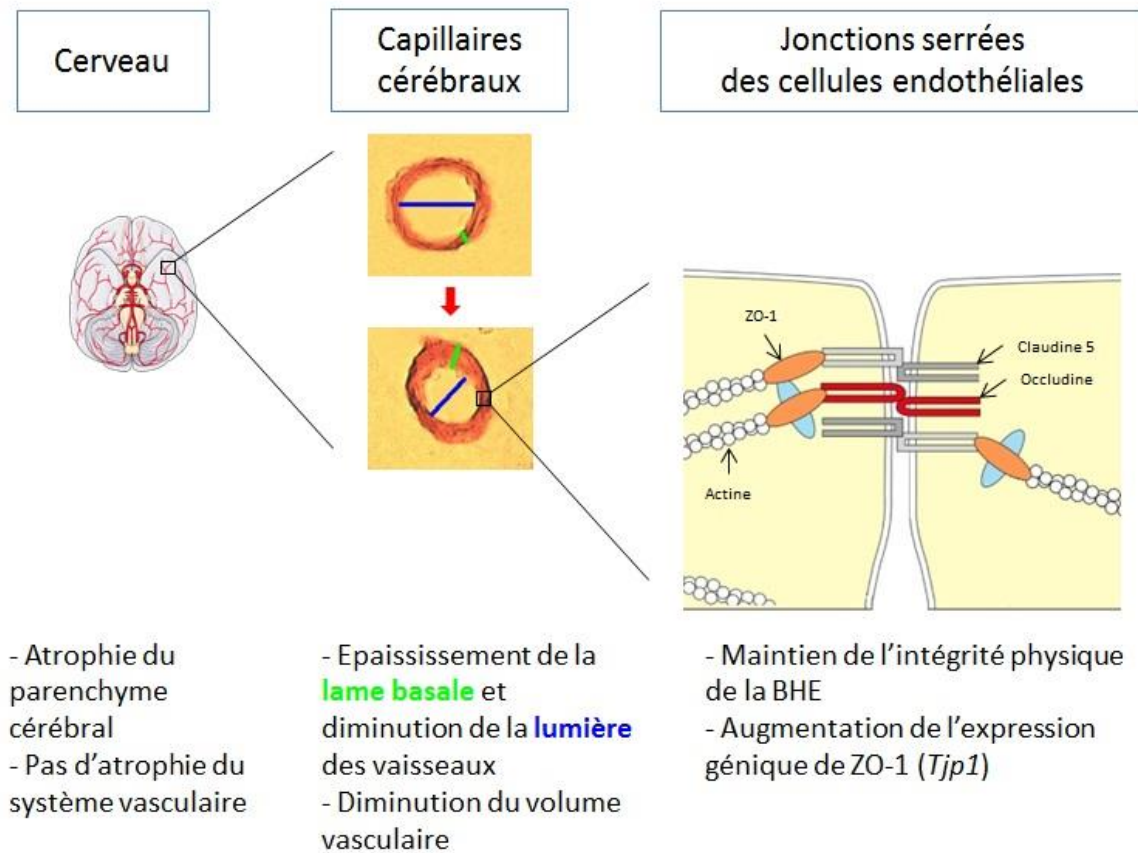


Figure 3 : Représentation schématique des modifications de l'arbre vasculaire, des capillaires cérébraux et de la perméabilité de la BHE dans le modèle p25 après 6 semaines d'induction [Adapté d'après (Uspenskaia et al., 2004) et (Förster, 2008)].

❖ Modifications de l'expression et/ou de la fonction des récepteurs et transporteurs exprimés à la barrière hémato-encéphalique dans la neurodégénérescence et la maladie d'Alzheimer et conséquences sur le transport cérébral de molécules endogènes et exogènes

En plus des modifications de perméabilité, de morphologie et de diffusion passive au travers de la BHE, des études ont mis en évidence des modulations des récepteurs et transporteurs impliqués dans l'influx/efflux cérébral de molécules endogènes dans la MA (voir partie II) [C.3. Modifications de l'intégrité fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique](#)). Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés d'une part au transport cérébral du glucose et des acides aminés (nutriments essentiels au bon fonctionnement du cerveau) et d'autre part au transport cérébral du peptide A β et du cholestérol (étroitement liés à la MA), dans le modèle p25 à 6 semaines d'induction, correspondant à un stade relativement avancé de neurodégénérescence, avec présence de protéine Tau hyperphosphorylée, altération du volume vasculaire et de la morphologie des microvaisseaux cérébraux. Enfin, nous discuterons de l'impact que de telles modulations peuvent avoir sur la pénétration cérébrale de composés exogènes comme par exemple PKRinh.

- [Modulations des transporteurs de nutriments](#)

Bien que le cerveau ne représente que 2% du poids du corps environ, il est le principal consommateur de glucose puisqu'il utilise entre 20 et 25% du glucose circulant au repos (Erbsloh et al., 1958). Les neurones, en particulier, sont les cellules ayant la plus forte demande énergétique (Howarth et al., 2012). Le métabolisme cérébral du glucose est indispensable pour le maintien des fonctions physiologiques du cerveau en permettant notamment la production d'ATP ou la synthèse de neurotransmetteurs (Mergenthaler et al., 2013). Au niveau du SNC, les réserves énergétiques intracellulaires sous forme de glycogène sont faibles et ne permettent pas le maintien de l'activité cérébrale au-delà de quelques minutes. Il y a donc un transport permanent de glucose au travers de la BHE *via* GLUT1 (La Schiazza et al., 2008). Celui-ci est finement régulé en conditions physiologiques et toute modification de l'expression et/ou de la fonction de GLUT1 peut avoir des conséquences graves sur l'homéostasie cérébrale (Patching, 2017). Plusieurs études ont mis en évidence une diminution précoce du métabolisme cérébral du glucose associé à une diminution de l'expression de GLUT1 dans la MA (Chen and Zhong, 2013; Horwood and Davies, 1994; Kalaria and Harik, 1989; Landau et al., 2011; Li et al., 2008; Mooradian et al.,

1997; Mosconi, 2005; Mosconi et al., 2008). Cet hypométabolisme cérébral serait présent en amont de l'apparition des symptômes et a été proposée comme marqueur diagnostique précoce de la MA (Ishii, 2014; Mosconi, 2005; Perani et al., 2014). Comme chez l'Homme, des études de PCIS ont montré que le transport cérébral du glucose était diminué chez les souris 3xTg-AD à 18 mois (Do et al., 2014), APOE4 à 12 mois (Alata et al., 2015) et p25 à 6 semaines ([Article 1](#)). Celui-ci s'accompagne d'une diminution de l'expression de Glut1 à la surface des CECCs chez les souris 3xTg-AD (Do et al., 2014), comme cela avait été précédemment mis en évidence dans le modèle APP/PS1 (Hooijmans et al., 2007b). En revanche, dans le modèle p25, l'expression du gène (*Slc2a1*) et celle de la protéine (Glut1) ne sont pas modifiées ([Article 1](#)). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. Tout d'abord, il a été montré chez l'Homme que la diminution de l'expression et de la fonction de GLUT1 n'était pas accompagnée d'une diminution de l'expression du gène *SLC2A1* dans la MA (Mooradian et al., 1997). Ceci suggère l'existence d'un mécanisme post-transcriptionnel responsable du déclin de l'expression de la protéine chez l'Homme (Patching, 2017). Un mécanisme de régulation post-traductionnel pourrait provoquer une perte de fonction ou bien une redistribution membranaire de la protéine chez les souris p25. Le fait que l'expression de Glut1 ne soit pas non plus diminuée dans le modèle APOE4 en dépit d'une diminution de sa fonction pourrait renforcer cette hypothèse (Alata et al., 2015). D'autre part, l'expression de GLUT3, un autre transporteur du glucose principalement neuronal, a été retrouvée diminuée chez les patients atteints de la MA (Harr et al., 1995; Simpson et al., 1994). Or, GLUT3, qui est beaucoup moins étudié que GLUT1, a aussi été retrouvé exprimé à la BHE, mais à une moindre concentration (Gerhart et al., 1992). Ainsi, une diminution de l'expression de Glut3 pourrait potentiellement être responsable de la diminution du transport cérébral du glucose chez les souris p25 ([Article 3](#)). Enfin, l'accès du glucose au cerveau est aussi régulé par l'hexokinase, l'enzyme catalysant la première étape (irréversible) de la glycolyse, transformant le glucose en glucose-6-phosphate qui se retrouve piégé dans la cellule (Tournier et al., 2015). Une modulation de l'activité de phosphorylation de l'hexokinase dans les CECCs pourrait alors avoir un impact sur l'accès du glucose au cerveau chez les souris p25, sans diminution de l'expression de Glut1. Collectivement, l'ensemble des données disponibles dans la littérature pour les modèles murins utilisés dans la MA, ainsi que les données que nous avons obtenues dans le modèle p25 (**Tableau 6**), mettent en évidence la présence d'une altération du transport cérébral du glucose à la BHE. Les mécanismes sous-jacents à cette altération doivent cependant encore être élucidés. Quoi qu'il en soit, ces résultats sont en accord avec les observations réalisées chez l'Homme et suggèrent donc que le déclin du transport cérébral du glucose est un élément important de la ND et de la pathogénèse de la MA.

Les acides aminés essentiels sont également indispensables au bon fonctionnement du SNC puisqu'ils participent à la synthèse de protéines et de neurotransmetteurs. Nous avons montré que l'expression du gène codant pour le transporteur Lat1 (*Slc7a5*), impliqué dans le transport cérébral des acides aminés essentiels, était augmentée chez les souris p25, mais sans modification de l'expression de la protéine, ni de la clairance cérébrale d'entrée de la phénylalanine ([Article 1](#)). Ces résultats pourraient suggérer un mécanisme de défense de la BHE qui tendrait à faire parvenir plus de nutriments aux cellules neuronales pour lutter contre la ND massive chez ces souris. L'absence de modification de l'expression de la protéine observée par imagerie confocale suggère que des modifications post-transcriptionnelles pourraient altérer l'expression protéique de ces transporteurs, ce qui compenserait l'augmentation de leur expression génique. Malheureusement, aucune étude n'a à ce jour étudié l'expression et la fonction de ce transporteur à la BHE d'autres modèles murins utilisés dans la MA ou chez le patient atteint de la MA ([Tableau 6](#)).

Modulations de la BHE	Modèles murins transgéniques				Homme
	Tg2576, PDAPP, TgCRND8, 5x <i>FAD</i> & <i>APP/PS1</i>	3x <i>Tg-AD</i>	p25	<i>APOE4</i>	
	Plaques Amyloïdes	Hyperphosphorylation de <i>Tau</i> + Plaques Amyloïdes	Hyperphosphorylation de <i>Tau</i> (6 semaines) + Neurodégénérescence	Altération du métabolisme du Cholestérol	
Transport du glucose et des acides aminés					
GLUT1	⬇ protéine Chez <i>APP/PS1</i> (IHC) (Hooijmans et al., 2007b)	⬇ protéine à 18 mois (IHC) (Do et al., 2014)	↔ <i>ARNm</i> (qRT-PCR) ↔ protéine (IHC) (Article 1)	↔ protéine (WB) (Alata et al., 2015)	↔ <i>ARNm</i> (Northern Blot) ⬇ protéine (WB, IHC) (Horwood and Davies, 1994; Kalaria and Harik, 1989; Mooradian et al., 1997)
LAT1		-	↗ <i>ARNm</i> (qRT-PCR) (Article 1)	-	-

Tableau 6 : Tableau comparatif de l'expression des transporteurs impliqués dans le transport du glucose et des acides aminés à la barrière hémato-encéphalique chez différents modèles murins transgéniques reproduisant certains aspects de la maladie d'Alzheimer ainsi que chez le patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

- *Modulations des récepteurs et transporteurs du peptide A β et du cholestérol*

Dans la FAD, qui ne concerne qu'une très faible proportion des patients atteints de la MA (<1%), des mutations sur les gènes codant pour l'APP ou les présénilines 1 et 2 se traduisent par une augmentation de la production d'A β , favorisant ainsi son accumulation cérébrale (Bekris et al., 2010; Goldman et al., 2011; Tanzi and Bertram, 2005). Cependant, dans le reste des cas, c'est-à-dire dans les formes sporadiques de la MA, ce serait plutôt un défaut de clairance du peptide A β au travers de la BHE qui serait responsable de son accumulation cérébrale (Mawuenyega et al., 2010). Le défaut de la clairance cérébrale du peptide A β dans la MA pourrait être le résultat de deux phénomènes : une augmentation de son influx et/ou une diminution de son efflux à la BHE. De plus, de nombreuses études ont montré qu'au niveau du SNC, une augmentation de la concentration en cholestérol favoriserait la voie amyloïdogénique du métabolisme de l'APP ainsi que la formation des plaques séniles (Ehehalt et al., 2003; Mizuno et al., 1999; Schneider et al., 2006; Xiong et al., 2008). D'après l'hypothèse vasculaire de la MA, une hypercholestérolémie ou la présence du gène *APOE ϵ 4*, pourraient contribuer à l'apparition des modifications cérébrovasculaires qui constituent la première étape de la pathogénèse de la MA (Nelson et al., 2016; Zlokovic, 2005, 2008, 2011). Le cholestérol cérébral étant presque exclusivement synthétisé *de novo* (Dietschy and Turley, 2001), une modulation de la clairance cérébrale du cholestérol pourrait également jouer un rôle dans la pathogénèse de la MA. Il est important de préciser que les mécanismes gouvernant le transport du peptide A β et du cholestérol à la BHE sont complexes et impliquent de nombreux récepteurs et transporteurs dont certains sont communs pour les deux substrats. Nous avons étudié les récepteurs et transporteurs actuellement connus pour être exprimés au niveau des CECCs et impliqués dans ces mécanismes mais il est probable que cette analyse ne soit pas exhaustive.

L'expression de LRP1 tout d'abord, impliqué dans l'efflux par transcytose du peptide A β à la BHE, a été retrouvée diminuée chez les patients atteints de la MA (Donahue et al., 2006; Jeynes and Provias, 2008; Shibata et al., 2000) et dans le modèle 3xTg-AD (Do et al., 2016), ce qui est en faveur de l'hypothèse d'un défaut de clairance du peptide A β au travers de la BHE. Cependant, aucune modification n'a été mise en évidence dans le modèle APOE4 (Alata et al., 2015) et nous avons montré une augmentation de l'expression génique de *Lrp1* chez les souris p25 ([Article 3](#)). Il faut tout d'abord préciser que nous avons étudié l'expression de *Lrp1* par qRT-PCR, alors que les études précédemment citées ont étudié l'expression de la protéine Lrp1 par Western-blot (Alata et al., 2015; Do et al., 2016) ou IHC (Donahue et al., 2006), ce qui pourrait, en partie, expliquer ces différences. D'autre part, il a été montré que LRP1, contrairement à RAGE, était co-localisé avec les plaques séniles (Donahue et al., 2006; Rebeck et al.,

1993; Tooyama et al., 1995) et Donahue et collaborateurs ont suggéré que la diminution de l'expression de LRP1 à la BHE pourrait être liée à la toxicité amyloïde (Donahue et al., 2006). L'absence de plaques séniles chez les souris p25 pourrait alors expliquer cette différence de modulation de Lrp1 par rapport au modèle 3xTg-AD et à l'Homme. Enfin, l'implication de LRP1 dans l'efflux cérébral du peptide A β à la BHE est sujette à débat. En effet, certaines études montrent que LRP1 serait exprimé à la membrane des péricytes, plutôt qu'à celle des CECCs (Candela et al., 2015; Gosselet et al., 2009), et d'autres suggèrent que LRP1 pourrait être le médiateur de l'internalisation, mais pas de la transcytose d'A β à la BHE (Nazer et al., 2008). Plus d'études sont donc nécessaires pour mieux comprendre le rôle exact de LRP1 à la BHE et ses modulations dans la MA (Do et al., 2016).

Une augmentation de l'expression de RAGE, le principal récepteur impliqué dans l'influx cérébral par transcytose du peptide A β a été mise en évidence chez le patient atteint de la MA (Donahue et al., 2006; Jaynes and Provias, 2008; Miller et al., 2008; Yan et al., 1996), mais aussi dans les modèles 3xTg-AD (Do et al., 2016) et APOE4 (Alata et al., 2015). Nous avons montré par qRT-PCR que le gène codant pour la protéine RAGE était augmenté chez les souris p25 ([Article 3](#)), ce qui semble confirmer que l'augmentation de l'influx cérébral du peptide A β est un élément clé dans la ND et dans la pathogénèse de la MA et ce, même en l'absence de pathologie amyloïde. Il est donc peu probable que la régulation positive de RAGE soit induite par l'augmentation des concentrations cérébrales de son ligand (A β), comme cela a déjà été suggéré (Bierhaus and Nawroth, 2009; Bierhaus et al., 2005; Yan et al., 1996, 2009). Le fait qu'une augmentation de l'expression de RAGE ait été retrouvée à la fois chez les patients atteints de la MA (présentant une ND ainsi qu'une pathologie Tau et amyloïde), chez les souris 3xTg-AD (présentant une pathologie Tau et amyloïde) et chez les souris p25 à 6 semaines d'induction (présentant une ND et pathologie Tau), suggère que pTau pourrait jouer un rôle dans les modifications d'expression de RAGE, tout comme il semblait être impliqué dans la régulation de la morphologie de la BHE (voir première partie de la discussion générale). De plus, l'étude réalisée par Do et collaborateurs chez les souris 3xTg-AD à différents âges suggère que la modulation de RAGE est l'une des premières modifications apparaissant à la BHE dans la MA, précédant les modulations des transporteurs d'efflux du peptide A β .

De plus en plus d'études s'intéressent également à la place occupée par les transporteurs ABC dans l'efflux cérébral d'A β et du cholestérol et à leurs modulations dans la MA. En effet, les efflux d'A β et du cholestérol semblent être liés (Burns et al., 2006; Saint-Pol et al., 2013) et sont suspectés de jouer un rôle important dans la pathogénèse de la MA (Ehehalt et al., 2003; Nelson et al., 2016; Xiong et al., 2008). Les transporteurs ABC connus à ce jour pour être impliqués dans l'efflux cérébral du peptide A β et du

cholestérol sont *Abca1*, *Abca2*, *Abcg1*, *Abcg2* (*Bcrp*), *Abcg4* et potentiellement *Abcb1* (P-gp) (voir partie II) [B.2.3. Transport médié par les ATP-binding carriers \(ABC\)](#)).

L'expression de la P-gp a été retrouvée diminuée chez les patients atteints de la MA (Vogelgesang et al., 2002; Wijesuriya et al., 2010) (mais sans modification de l'expression d'*ABCB1* (Chiu et al., 2015)), comme dans le modèle Tg2576 (Hartz et al., 2010). En revanche, Do et collaborateurs ont montré que l'expression de la P-gp était augmentée chez les souris 3xTg-AD âgées de 18 mois et que cela s'accompagnait d'une diminution de la capture cérébrale d'A β (Do et al., 2016). Chez les souris p25, nous avons montré que l'expression génique et protéique de la P-gp n'était pas modifiée ([Article 3](#)) mais que sa fonction d'efflux était significativement augmentée après 6 semaines d'induction, avec notamment une vitesse maximale d'efflux (V_{max}) multipliée par 3.3, par rapport aux souris WT ([Article 3](#)). Ces résultats suggèrent donc un gain de fonction de la P-gp chez les souris p25 après 6 semaines d'induction, dont les mécanismes moléculaires sous-jacents doivent être expliqués, et qui pourrait également se traduire par une augmentation de l'efflux cérébral du peptide A β chez ces souris.

Enfin, nous avons mis en évidence une régulation positive de tous les gènes codant pour des transporteurs d'efflux du peptide A β et/ou du cholestérol (*Abca1*, *Abca2*, *Abcg1*, *Abcg2* et *Abcg4*), à l'exception de la P-gp, chez les souris p25 à 6 semaines d'induction ([Article 3](#)). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez les patients atteints de la MA pour ABCA1 (Akram et al., 2010; Kim et al., 2010), ABCG2 (Xiong et al., 2009), et ABCG4 (Uehara et al., 2008) et chez les souris 3xTg-AD pour *Abca1*, *Abcg2* et *Abcg4* (Do et al., 2016). ABCA2 et ABCG1 n'ont pas encore fait l'objet, à notre connaissance, d'études chez l'Homme ou dans un modèle murin de MA. Il est intéressant de noter que seul *Abca1* était augmenté dès 3 semaines d'induction chez les souris p25, de la même façon que chez les souris 3xTg-AD où *Abca1* avait été retrouvé augmenté dès 3 mois, ce qui correspond à un stade très précoce de la pathologie chez ces souris (Do et al., 2016). Ainsi, nous suggérons que pTau pourrait être impliqué dans la survenue précoce de la régulation d'*Abca1* à la BHE. Il serait intéressant d'étudier les régulations d'*Abca1* dans d'autres modèles murins de la MA pour confirmer cette hypothèse. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de modification de la clairance d'entrée cérébrale du cholestérol chez les souris p25, par rapport aux souris WT ([Article 3](#)), contrairement à ce qui avait été observé chez les souris 3xTg-AD (Do et al., 2016), ce qui suggère l'existence d'autres modulations affectant le mécanisme complexe de transport du cholestérol à la BHE. Il aurait également été très intéressant d'étudier les conséquences de la modulation des transporteurs ABC sur la clairance d'entrée cérébrale du peptide A β , mais nous n'avons pas pu obtenir suffisamment de souris pour faire cette étude.

Ainsi, chez les souris p25 à 6 semaines d'induction, l'augmentation de l'expression des gènes codant pour Lrp1, Abcg2, Abcg4, et l'augmentation de la fonction d'efflux de la P-gp pourraient converger vers une augmentation significative de l'efflux cérébral du peptide A β . Simultanément à ces modifications, nous avons également mis en évidence une régulation positive du gène codant pour le récepteur RAGE, indiquant cette fois une possible augmentation de l'influx d'A β . Nous pouvons alors imaginer que, de même que chez les souris 3xTg-AD à 3 mois (Do et al., 2016), ces modulations se compensent chez les souris p25 pour aboutir à un équilibre entre l'influx et l'efflux du peptide A β à ce stade de la ND puisque ces souris ne présentent pas de pathologie amyloïde. Cependant, en dépit d'une absence de plaques amyloïdes dans ce modèle, Cruz et collaborateurs ont montré qu'il y avait une accumulation intraneuronale de peptide A β à partir de 8 semaines d'induction (Cruz et al., 2006), ce qui suggère que cet équilibre pourrait être rompu. Les études réalisées chez les souris 3xTg-AD suggèrent que la régulation positive d'Abcg4, contrairement à RAGE, n'était que transitoire et que l'influx d'A β deviendrait alors supérieur à son efflux au fur et à mesure de l'évolution de la pathologie, provoquant l'accumulation cérébrale d'A β (Do et al., 2016). Les résultats des études réalisées chez l'Homme semblent confirmer cette hypothèse puisqu'il a été montré que la clairance cérébrale du peptide A β est diminuée de 30% chez les patients atteints de la MA (Mawuenyega et al., 2010) et l'augmentation de l'expression de RAGE a été retrouvée dans les échantillons de cerveaux collectés en *post-mortem* chez ces patients (Donahue et al., 2006; Miller et al., 2008; Yan et al., 1996). Il serait donc très intéressant de mesurer l'expression des transporteurs Lrp1, Abcg2, Abcg4 et P-gp chez les souris p25 après 8 semaines d'induction, c'est-à-dire à une période où une accumulation intracellulaire d'A β est observée, ainsi que chez les patients atteints de la MA.

Collectivement, l'ensemble des données disponibles dans la littérature portant sur les récepteurs et transporteurs du peptide A β et du cholestérol dans les modèles murins utilisés dans la MA, ainsi que les données que nous avons obtenues dans le modèle p25 (**Tableau 7** et **Figure 4**), suggèrent que des mécanismes de régulation de l'intégrité fonctionnelle de la BHE interviennent au cours de la ND. Ces modulations semblent être particulièrement impliqués dans la pathogénèse de la MA, notamment via le contrôle de l'équilibre entre l'influx et l'efflux de substances neurotoxiques comme le peptide A β .

Modulations de la BHE	Modèles murins transgéniques				Homme
	Tg2576	3xTg-AD	p25	APOE4	
	Plaques Amyloïdes	Hyperphosphorylation de Tau + Plaques Amyloïdes	Hyperphosphorylation de Tau (6 semaines) + Neurodégénérescence	Altération du métabolisme du Cholestérol	
Transport du peptide Aβ et du cholestérol					
RAGE	-	↗ protéine (WB) (Do et al., 2016)	↗ ARNm (qRT-PCR) (Article 3)	↗ protéine à 12 mois (WB) (Alata et al., 2015)	↗ protéine (IHC, WB) (Donahue et al., 2006; Jaynes and Provias, 2008; Miller et al., 2008)
OATP1A2/ Oatp1a4	-	↔ protéine (WB) (Do et al., 2016)	↔ ARNm (qRT-PCR) (Article 3)	-	-
LRP1	-	↘ protéine à 18 mois (WB) (Do et al., 2016)	↗ ARNm (qRT-PCR) (Article 3)	↔ protéine (WB) (Alata et al., 2015)	↘ protéine (IHC, WB) (Donahue et al., 2006; Jaynes and Provias, 2008; Shibata et al., 2000)
ABCB1 (P-gp)	↘ protéine Chez Tg2576 (WB) (Hartz et al., 2010)	↗ protéine à 18 mois (WB) (Do et al., 2016)	↔ ARNm (qRT-PCR) ↔ protéine (qRT-PCR) (Article 3)	-	↔ ARNm (qRT-PCR) ↘ protéine (IHC) (Chiu et al., 2015; Vogelgesang et al., 2002; Wijesuriya et al., 2010)
ABCG2 (BCRP)	-	↗ protéine à 18 mois (WB) (Do et al., 2016)	↗ ARNm (qRT-PCR) (Article 3)	-	↔ ou ↗ ARNm (qRT-PCR) ↗ protéine (IHC, WB) (Wijesuriya et al., 2010; Xiong et al., 2009)
ABCG4	-	↗ protéine à 3 mois seulement (WB) (Do et al., 2016)	↗ ARNm (qRT-PCR) (Article 3)	-	↗ ARNm (qRT-PCR) ↗ protéine (IHC, WB) dans la microglie (Uehara et al., 2008)
ABCA1	-	↗ protéine dès 3 mois (WB) (Do et al., 2016)	↗ ARNm (qRT-PCR) (Article 3)	-	-
ABCA2	-	-	↗ ARNm (qRT-PCR) (Article 3)	-	-
ABCG1	-	-	↗ ARNm (qRT-PCR) (Article 3)	-	-

Tableau 7 : Tableau comparatif de l'expression des récepteurs et transporteurs impliqués dans le transport du peptide A β et du cholestérol à la barrière hémato-encéphalique chez différents modèles murins transgéniques reproduisant certains aspects de la maladie d'Alzheimer ainsi que chez le patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

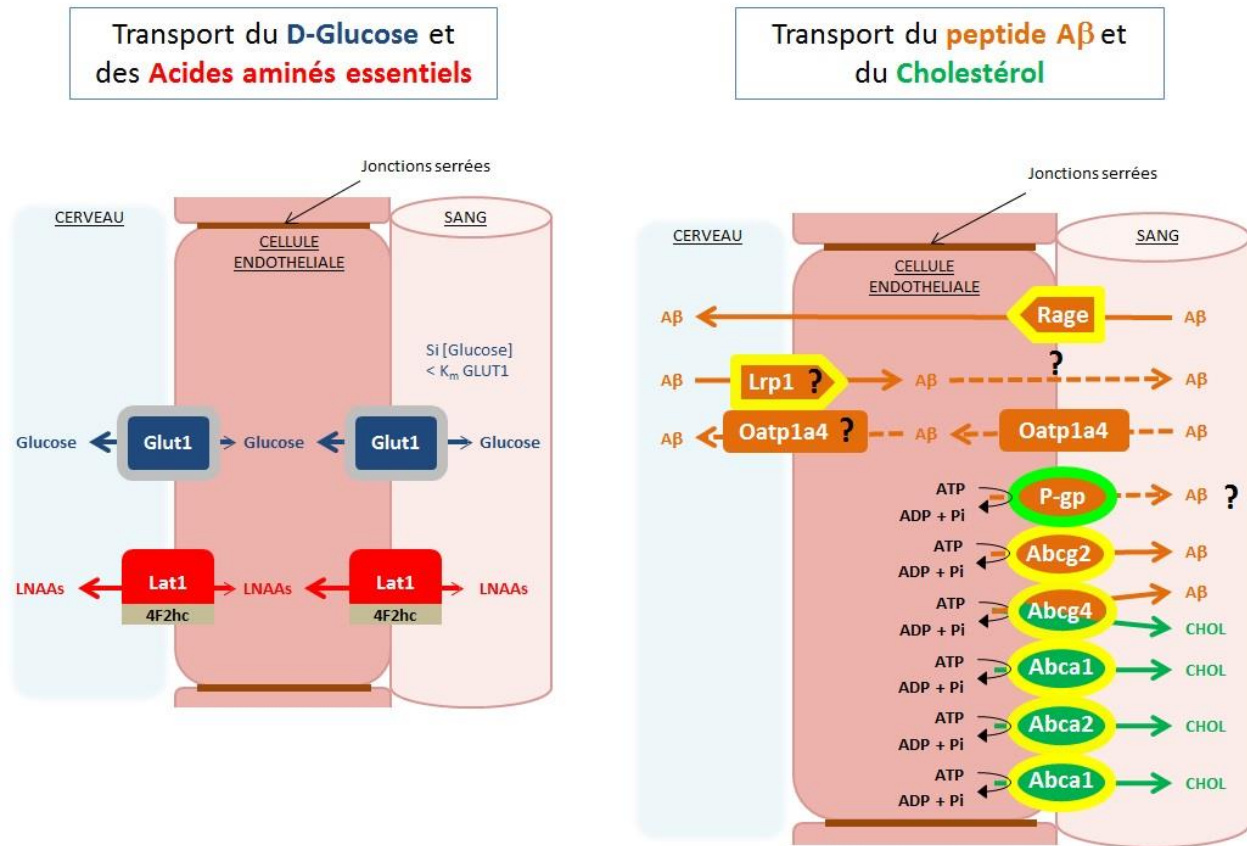


Figure 4 : Représentation schématique des modifications d'expression et de fonction des récepteurs et transporteurs impliqués dans le transport de molécules endogènes (glucose, acides aminés, peptide A β et cholestérol) à la BHE dans le modèle p25 après 6 semaines d'induction. Les transporteurs et récepteurs entourés en jaune sont ceux dont l'expression du gène (mesurée par qRT-PCR) a été retrouvée augmentée chez les souris p25 par rapport aux souris WT. Du point de vue de la fonction (mesurée par PCIS), les transporteurs entourés en vert et en gris sont ceux pour lesquels la fonction est respectivement augmentée et diminuée chez les souris P25, par rapport aux souris WT. Les points d'interrogation correspondent aux récepteurs et transporteurs pour lesquels la localisation au niveau des CECCs ou le rôle exact dans le transport des molécules endogènes étudiées ne sont pas encore clairement élucidés.

- *Conséquences des modifications de la barrière hémato-encéphalique sur la pénétration cérébrale de molécules exogènes*

Nous avons souhaité savoir si les modifications de l'intégrité fonctionnelle évoquées dans le paragraphe précédent pouvaient avoir un impact sur le passage de la BHE d'un xénobiotique à visée cérébrale dans

un contexte de ND sévère. Pour cela, nous avons dans un premier temps étudié la distribution plasmatique et cérébrale d'un candidat médicament (PKRinh), développé par le laboratoire Sanofi dans les maladies neurodégénératives, chez des souris saines (WT). Cette étude a fait l'objet de l'[Article 2](#). PKRinh est un inhibiteur sélectif de l'activation de PKR, qui a démontré son efficacité *in vivo* avec une diminution de la perte neuronale, de la synthèse de BACE1, et de la production d'A β dans un modèle murin de neurodégénérescence induite par une carence en thiamine (*thiamine deficiency (TD) model*) (Mouton-Liger et al., 2015).

Nous avons tout d'abord montré que PKRinh présentait une non-linéarité pharmacocinétique plasmatique suite à son administration par voie orale à trois doses (10, 30 et 100 mg/kg), qui n'était pas retrouvée au niveau cérébral. De plus, la partition cerveau-plasma de la fraction libre ($K_{p,u,b,brain}$) de PKRinh était inférieure à 1 à toutes les doses de l'étude, suggérant l'existence d'un mécanisme d'efflux actif à la BHE (Hammarlund-Udenaes et al., 1997; Tunblad et al., 2003; Xie et al., 2000). Nous avons utilisé la technique de perfusion cérébrale *in situ* pour étudier les mécanismes en jeu dans le passage de la BHE de PKRinh chez la souris saine. Celle-ci a révélé que PKRinh présentait une clairance d'entrée cérébrale élevée (Cl_{up} = 14 μ l/g/s) lorsque PKRinh était perfusé à concentration traçante, et qui augmentait progressivement avec la concentration de PKRinh dans le perfusé, jusqu'à atteindre un plateau. Nous avons ainsi pu déterminer que le transport de PKRinh à travers la BHE était constitué d'une composante de diffusion passive (favorisée par la grande lipophilie de PKRinh : $cLogP$ = 5,1), et d'une composante d'efflux, active et saturable, dont nous avons pu calculer les paramètres de transport : K_m $\approx$ 3 μ M et V_{max} $\approx$ 0,4 nmol/g/s. Ces paramètres nous ont permis d'affirmer que la composante d'efflux n'était pas saturée aux concentrations circulantes de l'étude, ce qui explique l'absence de non-linéarité cérébrale à ces doses. Enfin, grâce à l'utilisation de souris déficientes en P-gp et BCRP (souris TKO, *mdr1a/1b/bcrp*^{-/-}) ainsi que de différents inhibiteurs de transporteurs d'influx connus pour être exprimés à la face luminale des CECCs, nous avons pu identifier la P-gp comme transporteur d'efflux de PKRinh à la BHE, avec un rapport d'efflux d'environ 4, ce qui suggère que PKRinh est un très bon substrat de la P-gp. De plus, PKRinh n'était pris en charge par aucun des transporteurs d'influx connu et décrit à la BHE.

Nous pouvons noter que PKRinh possède des caractéristiques neuropharmacocinétiques très intéressantes. En effet, les autres xénobiotiques ayant été identifiés comme étant de bons substrats de la P-gp, c'est-à-dire ayant un rapport d'efflux supérieur à 2, présentent une restriction importante de leur clairance d'entrée cérébrale, avec des Cl_{up} généralement inférieures à 1 μ l/g/s (Cisternino et al., 2003; Drion et al., 1996; Obradovic et al., 2007). PKRinh possède donc un passage de la BHE élevé en dépit du

fait qu'il soit un très bon substrat de la p-gp, et présente une extraction cérébrale presque totale lorsque la P-gp est inhibée (Cl_{up} = 54,2 μ l/g/s), c'est-à-dire que son passage de la BHE devient flux-dépendant, comme c'est le cas pour des molécules de référence comme le diazépam, la buspirone ou encore la chlorpromazine (Alata et al., 2015; Cattelotte et al., 2008; Dagenais et al., 2009). Il était donc particulièrement intéressant d'étudier les conséquences que les modifications de la BHE chez les souris p25 pouvaient avoir sur le passage de la BHE de PKRinh.

Après 6 semaines d'induction, les souris p25 présentent une BHE physiquement intacte, ce qui signifie que la composante de diffusion passive de PKRinh ne devrait pas être modifiée. Cependant, les souris p25 présentent une capacité d'efflux de la P-gp significativement augmentée, se traduisait par une réduction significative de la clairance d'entrée cérébrale de PKRinh (Cl_{up} = 7 μ l/g/s chez les p25 vs. 14 μ l/g/s chez les souris WT) ([Article 3](#)).

Ainsi, les modifications de l'intégrité fonctionnelle de la BHE dans le modèle p25 ont un impact direct sur le passage de PKRinh à travers la BHE, ce qui suggère que l'exposition cérébrale de PKRinh pourrait être surestimée dans ce modèle murin et, si les mêmes régulations ont lieu, chez les patients atteints de la MA. D'une manière générale, cette régulation de la P-gp pourrait avoir des conséquences importantes en termes d'efficacité de xénobiotiques à visée cérébrale, notamment pour les substances qui seraient de bons substrats de la P-gp et ce, d'autant plus que leur clairance d'entrée cérébrale serait faible chez les souris WT.

Ces résultats confirment donc l'importance de la BHE dans la distribution cérébrale des xénobiotiques à visée cérébrale et de la caractérisation à la fois des mécanismes impliqués dans le passage de cette barrière pour un nouveau candidat médicament, mais aussi de l'intégrité physique et fonctionnelle de la BHE dans le modèle animal mimant la pathologie d'intérêt afin de prédire, de la façon la plus juste possible, l'efficacité du xénobiotique en conditions pathologiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos travaux ont permis d'approfondir les connaissances actuelles sur les modifications de l'intégrité physique et fonctionnelle de la BHE dans un contexte de ND et de pathologie Tau grâce à l'utilisation du modèle p25. En effet, du point de vue neuropathologique, la MA est caractérisée par l'association de pathologies amyloïde (accumulation extracellulaire d'A β) et Tau (accumulation intra-neuronale de protéine pTau) ainsi que d'une ND. Cependant, la BHE n'a été étudiée chez la souris que dans un contexte de pathologie amyloïde seule, ou bien associée à la pathologie Tau. Nous avons souhaité explorer l'impact que pouvait avoir l'association d'une ND et d'une pathologie Tau sur l'intégrité de la BHE chez la souris.

Nous avons tout d'abord montré que, malgré une ND sévère, les souris p25 ne présentent pas d'altération de la perméabilité de la BHE, contrairement à ce qui est suggéré par l'hypothèse neurovasculaire de la MA. Si ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans différents modèles murins de MA, les études réalisées chez l'Homme ont fourni des résultats fluctuants et l'ouverture de la BHE dans la MA fait encore débat. Ces fluctuations proviennent notamment de la difficulté d'étudier la BHE chez l'Homme, et de l'incertitude associée au diagnostic *ante-mortem* de la MA. Il est donc très important de poursuivre l'étude de la BHE dans les modèles murins pour mieux comprendre les liens entre les différents aspects pathologiques de la MA reproduits par ces modèles et les modifications de la BHE associées.

Au contraire, nos résultats mettent en évidence des modifications morphologiques des microvaisseaux cérébraux, comme un épaississement de la lame basale et une augmentation de l'expression génique de *Tjp1*, aboutissant à la diminution du volume vasculaire cérébral. Ces résultats sont en accord avec des résultats préalablement obtenus chez les souris 3xTg-AD, et dans deux autres modèles murins présentant une pathologie Tau, mais pas sur des modèles ne présentant que la pathologie amyloïde, ce qui suggère l'implication de pTau dans ce phénomène. Il pourrait être intéressant de poursuivre l'étude de la BHE dans un autre modèle de MA présentant cette fois-ci une neurodégénérescence associée à la pathologie amyloïde mais non associée à pTau, tel le modèle 5xFAD (Eimer and Vassar, 2013).

D'un point de vue fonctionnel, les souris p25 présentent une diminution du transport cérébral du glucose au travers de leur BHE, comme cela a été observé chez les patients atteints de la MA et dans tous les

modèles murins de la MA pour lesquels ce transport a été étudié. L'altération de l'apport du glucose au cerveau *via* la BHE semble être un élément clé dans la pathogénèse des MND et plus particulièrement de la MA. De plus, il semble que la régulation du transport cérébral du glucose intervient très en amont dans la pathogénèse de la MA, et notamment avant l'apparition des symptômes, et que l'hypométabolisme cérébral soit corrélé à la sévérité de la maladie. Chez l'Homme, l'étude du métabolisme cérébral du glucose peut être réalisée de façon relativement peu invasive grâce à l'imagerie TEP. Si celui-ci n'est pas réalisé de façon systématique pour porter un diagnostic de MA, il peut néanmoins s'avérer utile lorsque les tests neuropsychologiques sont de réalisation ou d'interprétation difficile, en cas de démence atypique ou encore pour un diagnostic différentiel avec d'autres démences, notamment les atrophies fronto-temporales. En revanche, des études sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à cette altération de transport en l'absence de modification du gène et de la protéine du transporteur du glucose à la BHE, comme c'est le cas par exemple chez les souris p25.

De plus, nous avons montré que les souris p25 présentaient une régulation positive de *Rage*, *d'Abca1*, *d'Abcg2* et *d'Abcg4*, comme cela avait été précédemment observé chez les souris 3xTg-AD et chez les patients atteints de la MA. Sachant que les souris p25 et 3xTg-AD ont en commun la présence de pTau, tout comme les patients atteints de la MA, nous suggérons que pTau puisse également jouer un rôle dans les modifications fonctionnelles de la BHE dans la ND, et en particulier dans la MA. Cette hypothèse pourrait être vérifiée sur la BHE humaine, par différentes approches. Nous pourrions étudier, *in vitro*, l'effet de pTau sur l'expression de *Rage*, *Abca1*, *Abcg2* et *Abcg4* sur une lignée de cellules endothéliales cérébrales humaines, comme par exemple les cellules hCMEC/D3, qui sont régulièrement utilisées pour l'étude de la BHE humaine. Il serait également intéressant de confronter nos résultats à la pathologie humaine en mesurant l'expression de ces récepteurs et transporteurs sur des coupes de cerveaux issues de patients atteints de MA à différents stades de la pathologie, vs. des patients MCI ou non déments.

L'ensemble des gènes codant pour les récepteurs et transporteurs actuellement connus pour être impliqués dans l'efflux d'A β et du cholestérol à la BHE sont positivement régulés chez les souris p25, à l'exception de la P-gp. Cependant, la clairance d'entrée cérébrale du cholestérol chez ces souris est inchangée. Ceci suggère que les mécanismes de transport impliqués dans le maintien de l'homéostasie cérébrale du cholestérol sont complexes et que d'autres modulations, non explorées par nos travaux, pourraient être en jeu dans la ND. Nous n'avons pas pu étudier la clairance d'entrée cérébrale du peptide A β chez les souris p25 par la technique de perfusion cérébrale *in situ*. En revanche, nos résultats semblent indiquer qu'il pourrait y avoir un déséquilibre entre les mécanismes d'influx (notamment médié par

Rage) et d'efflux de l'A β chez ces souris, et que l'influx pourrait devenir majoritaire au cours du développement de la pathologie chez les souris p25, aboutissant à une accumulation intraneuronale d'A β à partir de 8 semaines d'induction par p25. Ainsi, il serait très intéressant d'explorer la clairance d'entrée cérébrale du peptide A β chez les souris p25 à différents stades de la pathologie, et notamment après 7 et 8 semaines d'induction, pour déterminer à quel moment apparaît ce déséquilibre.

Enfin, nous avons montré que la capacité d'efflux de la P-gp est augmentée chez les souris p25 et ce, sans que nous ayons pu mettre en évidence une modification de l'expression du gène ni de la protéine. Ce gain de fonction de la P-gp s'est traduit par une diminution de la clairance d'entrée cérébrale de PKRinh, un candidat médicament à visée cérébrale et substrat de la P-gp. Ce phénomène est important à prendre en compte lors du développement de nouveaux médicaments du SNC car il pourrait conduire à une surestimation de la distribution cérébrale de nombreuses substances. En effet, du fait de la faible spécificité de substrat de la P-gp et de sa forte expression à la BHE, de nombreux candidats médicaments à visée cérébrale pourraient être impactés s'il s'avère que ce gain de fonction est confirmé chez l'Homme. Il paraît donc intéressant d'explorer la fonction de la P-gp dans différents modèles murins de MA ainsi que chez les patients atteints de la MA.

En conclusion, nos travaux apportent de nouvelles connaissances sur les liens existant entre lésions neuropathologiques et les modifications neurovasculaires dans un contexte de ND et de pathologie Tau et soulèvent l'importance de la caractérisation des mécanismes de transport impliqués dans le passage de la BHE d'un candidat médicament à visée cérébrale pour anticiper sa distribution cérébrale dans les modèles murins de MA ainsi que chez le patient atteint de la MA.

REFERENCES

- Abbott, N.J. (2013). Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 437–449.
- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53.
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37, 13–25.
- Agus, D.B., Gambhir, S.S., Pardridge, W.M., Spielholz, C., Baselga, J., Vera, J.C., and Golde, D.W. (1997). Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J. Clin. Invest.* 100, 2842–2848.
- Aharony, I., Ehrnhoefer, D.E., Shruster, A., Qiu, X., Franciosi, S., Hayden, M.R., and Offen, D. (2015). A Huntingtin-based peptide inhibitor of caspase-6 provides protection from mutant Huntingtin-induced motor and behavioral deficits. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2604–2614.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., et al. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 383–421.
- Akiyama, H., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., and McGeer, P.L. (2001). Immunohistochemical localization of neprilysin in the human cerebral cortex: inverse association with vulnerability to amyloid beta-protein (A β) deposition. *Brain Res.* 902, 277–281.
- Akram, A., Schmeidler, J., Katsel, P., Hof, P.R., and Haroutunian, V. (2010). Increased expression of cholesterol transporter ABCA1 is highly correlated with severity of dementia in AD hippocampus. *Brain Res.* 1318C, 167.
- Alafuzoff, I., Adolfsson, R., Bucht, G., and Winblad, B. (1983). Albumin and immunoglobulin in plasma and cerebrospinal fluid, and blood-cerebrospinal fluid barrier function in patients with dementia of Alzheimer type and multi-infarct dementia. *J. Neurol. Sci.* 60, 465–472.
- Alafuzoff, I., Adolfsson, R., Grundke-Iqbal, I., and Winblad, B. (1987). Blood-brain barrier in Alzheimer dementia and in non-demented elderly. An immunocytochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 73, 160–166.
- Alata, W., Ye, Y., St-Amour, I., Vandal, M., and Calon, F. (2015). Human apolipoprotein E ϵ 4 expression impairs cerebral vascularization and blood-brain barrier function in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 86–94.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *The Shape and Structure of Proteins*.
- Algotsson, A., and Winblad, B. (2007). The integrity of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 115, 403–408.
- Allinson, T.M.J., Parkin, E.T., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J. Neurosci. Res.* 74, 342–352.
- Alzheimer, A. (1911). Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z. Für Gesamte Neurol. Psychiatr.* 4 Pp 356–385.
- Alzheimer's Association (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 12, 459–509.
- Andreadis, A. (2005). Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1739, 91–103.

- Andrews-Zwilling, Y., Bien-Ly, N., Xu, Q., Li, G., Bernardo, A., Yoon, S.Y., Zwilling, D., Yan, T.X., Chen, L., and Huang, Y. (2010). Apolipoprotein E4 causes age- and Tau-dependent impairment of GABAergic interneurons, leading to learning and memory deficits in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 13707–13717.
- Annino, T., Tammur, J., Hutchinson, A., Rzhetsky, A., Dean, M., and Allikmets, R. (2001). Human and mouse orthologs of a new ATP-binding cassette gene, ABCG4. *Cytogenet. Cell Genet.* 94, 196–201.
- Anoop, A., Singh, P.K., Jacob, R.S., and Maji, S.K. (2010). CSF Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2010.
- Aouba, A., Eb, M., Rey, G., Pavillon, G., and Jougl, É. (2011). Données sur la mortalité en France: principales causes de décès en 2008 et évolutions depuis 2000. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* n°22, 7 juin 2011.
- Arab, L., and Sabbagh, M.N. (2010). Are certain lifestyle habits associated with lower Alzheimer's disease risk? *J. Alzheimers Dis. JAD* 20, 785–794.
- Araki, W., Kitaguchi, N., Tokushima, Y., Ishii, K., Aratake, H., Shimohama, S., Nakamura, S., and Kimura, J. (1991). Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 265–271.
- Arendt, T. (2004). Neurodegeneration and plasticity. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 22, 507–514.
- Arendt, T., Schindler, C., Brückner, M.K., Eschrich, K., Bigl, V., Zedlick, D., and Marcova, L. (1997). Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 516–529.
- Arendt, T., Stieler, J.T., and Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Res. Bull.* 126, 238–292.
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., et al. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468, 557–561.
- van Assema, D.M.E., Lubberink, M., Bauer, M., van der Flier, W.M., Schuit, R.C., Windhorst, A.D., Comans, E.F.I., Hoetjes, N.J., Tolboom, N., Langer, O., et al. (2012). Blood-brain barrier P-glycoprotein function in Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* 135, 181–189.
- Attems, J., Jellinger, K.A., and Lintner, F. (2005). Alzheimer's disease pathology influences severity and topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 110, 222–231.
- Atwood, C.S. (2005). Alzheimer's disease: the impact of age-related changes in reproductive hormones. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 255–256.
- Atwood, C.S., Martins, R.N., Smith, M.A., and Perry, G. (2002). Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid- β peptide and associated proteins. *Peptides* 23, 1343–1350.
- Austin, B.P., Nair, V.A., Meier, T.B., Xu, G., Rowley, H.A., Carlsson, C.M., Johnson, S.C., and Prabhakaran, V. (2011). Effects of hypoperfusion in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 26 Suppl 3, 123–133.
- Avila, J., Jiménez, J.S., Sayas, C.L., Bolós, M., Zabala, J.C., Rivas, G., and Hernández, F. (2016). Tau Structures. *Front. Aging Neurosci.* 8, 262.
- Bailey, T.L., Rivara, C.B., Rocher, A.B., and Hof, P.R. (2004). The nature and effects of cortical microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* 26, 573–578.
- Balaraman, Y., Limaye, A.R., Levey, A.I., and Srinivasan, S. (2006). Glycogen synthase kinase 3 β and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 1226–1235.
- Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., and Kelly, J.W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319, 916–919.

- Balda, M.S., González-Mariscal, L., Contreras, R.G., Macias-Silva, M., Torres-Marquez, M.E., García-Sáinz, J.A., and Cereijido, M. (1991). Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. *J. Membr. Biol.* **122**, 193–202.
- Bales, K.R. (2010). Brain lipid metabolism, apolipoprotein E and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **59**, 295–302.
- Ballatore, C., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 663–672.
- Banks, W.A. (2009). Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol.* **9 Suppl 1**, S3.
- Barker, C.F., and Billingham, R.E. (1977). Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* **25**, 1–54.
- Barrantes, F.J., Borroni, V., and Vallés, S. (2010). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor-cholesterol crosstalk in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* **584**, 1856–1863.
- Bauer, M., Karch, R., Zeitlinger, M., Stanek, J., Philippe, C., Wadsak, W., Mitterhauser, M., Jäger, W., Haslacher, H., Müller, M., et al. (2013). Interaction of 11C-Tarividar and 11C-Elacridar with P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein at the Human Blood-Brain Barrier. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **54**.
- Baumgart, M., Snyder, H.M., Carrillo, M.C., Fazio, S., Kim, H., and Johns, H. (2015). Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* **11**, 718–726.
- Bayer, A.J., Bullock, R., Jones, R.W., Wilkinson, D., Paterson, K.R., Jenkins, L., Millais, S.B., and Donoghue, S. (2005). Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic Abeta42 (AN1792) in patients with AD. *Neurology* **64**, 94–101.
- Bayer, T.A., Fossgreen, A., Czech, C., Beyreuther, K., and Wiestler, O.D. (1996). Plaque formation in brain transplants exposed to human beta-amyloid precursor protein 695. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **92**, 130–137.
- Bayes-Genis, A., Barallat, J., and Richards, A.M. (2016). A Test in Context: Neprilysin: Function, Inhibition, and Biomarker. *J. Am. Coll. Cardiol.* **68**, 639–653.
- Beaulieu, E., Demeule, M., Ghiteanu, L., and Béliveau, R. (1997). P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem. J.* **326 (Pt 2)**, 539–544.
- Beffert, U., Cohn, J.S., Petit-Turcotte, C., Tremblay, M., Aumont, N., Ramassamy, C., Davignon, J., and Poirier, J. (1999). Apolipoprotein E and beta-amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Res.* **843**, 87–94.
- Begley, D.J. (2004a). ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 1295–1312.
- Begley, D.J. (2004b). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol. Ther.* **104**, 29–45.
- Bekris, L.M., Yu, C.-E., Bird, T.D., and Tsuang, D.W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **23**, 213–227.
- Bell, R.D., and Zlokovic, B.V. (2009). Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **118**, 103–113.
- Bell, R.D., Sagare, A.P., Friedman, A.E., Bedi, G.S., Holtzman, D.M., Deane, R., and Zlokovic, B.V. (2007). Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **27**, 909–918.
- Bell, R.D., Winkler, E.A., Sagare, A.P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., and Zlokovic, B.V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* **68**, 409–427.
- Benneicib, M., Gong, C.-X., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001). Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett.* **490**, 15–22.

- Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J.C., Curran, E., Citron, M., and Vassar, R. (2000). Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J. Biol. Chem.* 275, 20647–20651.
- Bernacki, J., Dobrowolska, A., Nierwińska, K., and Małecki, A. (2008). Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol. Rep.* 60, 600–622.
- Bernstein, H.G., Ansorge, S., Riederer, P., Reiser, M., Frölich, L., and Bogerts, B. (1999). Insulin-degrading enzyme in the Alzheimer's disease brain: prominent localization in neurons and senile plaques. *Neurosci. Lett.* 263, 161–164.
- Bertram, L., Lill, C.M., and Tanzi, R.E. (2010). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* 68, 270–281.
- Berzin, T.M., Zipser, B.D., Rafii, M.S., Kuo-Leblanc, V., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J., Fallon, J.R., and Stopa, E.G. (2000). Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 349–355.
- Beyreuther, K., Pollwein, P., Multhaup, G., Mönning, U., König, G., Dyrks, T., Schubert, W., and Masters, C.L. (1993). Regulation and expression of the Alzheimer's beta/A4 amyloid protein precursor in health, disease, and Down's syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695, 91–102.
- Bian, F., Nath, R., Sobocinski, G., Booher, R.N., Lipinski, W.J., Callahan, M.J., Pack, A., Wang, K.K.-W., and Walker, L.C. (2002). Axonopathy, tau abnormalities, and dyskinesia, but no neurofibrillary tangles in p25-transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* 446, 257–266.
- Bierhaus, A., and Nawroth, P.P. (2009). Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia* 52, 2251–2263.
- Bierhaus, A., Humpert, P.M., Morcos, M., Wendt, T., Chavakis, T., Arnold, B., Stern, D.M., and Nawroth, P.P. (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 83, 876–886.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., and LaFerla, F.M. (2005). Intraneuronal Aβ causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45, 675–688.
- Binder, L.I., Frankfurter, A., and Rebhun, L.I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 101, 1371–1378.
- Binnewijzend, M.A.A., Benedictus, M.R., Kuijter, J.P.A., van der Flier, W.M., Teunissen, C.E., Prins, N.D., Wattjes, M.P., van Berckel, B.N.M., Scheltens, P., and Barkhof, F. (2016). Cerebral perfusion in the predementia stages of Alzheimer's disease. *Eur. Radiol.* 26, 506–514.
- Biron, K.E., Dickstein, D.L., Gopaul, R., and Jefferies, W.A. (2011). Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease. *PLoS One* 6, e23789.
- Björkhem, I. (2006). Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J. Intern. Med.* 260, 493–508.
- Björkhem, I., and Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 806–815.
- Björkhem, I., Heverin, M., Leoni, V., Meaney, S., and Diczfalussy, U. (2006). Oxysterols and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 185, 43–49.
- Blanchard, V., Moussaoui, S., Czech, C., Touchet, N., Bonici, B., Planche, M., Canton, T., Jedidi, I., Gohin, M., Wirths, O., et al. (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Aβ deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp. Neurol.* 184, 247–263.
- Blazer, D.G., Yaffe, K., and Liverman, C.T. (2015). *Cognitive Aging: Progress in Understanding and Opportunities for Action*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Blennow, K., Wallin, A., Fredman, P., Karlsson, I., Gottfries, C.G., and Svennerholm, L. (1990). Blood-brain barrier disturbance in patients with Alzheimer's disease is related to vascular factors. *Acta Neurol. Scand.* 81, 323–326.

- Blinzinger, K., and Kreutzberg, G. (1968). Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 85, 145–157.
- Bodzioch, M., Orsó, E., Klucken, J., Langmann, T., Böttcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Büchler, C., Porsch-Ozcürümez, M., et al. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* 22, 347–351.
- Bonnet, M.C., Weil, R., Dam, E., Hovanessian, A.G., and Meurs, E.F. (2000). PKR stimulates NF-kappaB irrespective of its kinase function by interacting with the IkappaB kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4532–4542.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., et al. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17, 1005–1013.
- Bose, A., Mouton-Liger, F., Paquet, C., Mazot, P., Vigny, M., Gray, F., and Hugon, J. (2011). Modulation of tau phosphorylation by the kinase PKR: implications in Alzheimer's disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 21, 189–200.
- Bourasset, F., Ouellet, M., Tremblay, C., Julien, C., Do, T.M., Oddo, S., LaFerla, F., and Calon, F. (2009). Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 56, 808–813.
- Bouvier, D.S., Jones, E.V., Quesseveur, G., Davoli, M.A., A Ferreira, T., Quirion, R., Mechawar, N., and Murai, K.K. (2016). High Resolution Dissection of Reactive Glial Nets in Alzheimer's Disease. *Sci. Rep.* 6, 24544.
- Bredesen, D.E., Rao, R.V., and Mehlen, P. (2006). Cell death in the nervous system. *Nature* 443, 796–802.
- Brenn, A., Grube, M., Peters, M., Fischer, A., Jedlitschky, G., Kroemer, H.K., Warzok, R.W., and Vogelgesang, S. (2011). Beta-Amyloid Downregulates MDR1-P-Glycoprotein (Abcb1) Expression at the Blood-Brain Barrier in Mice. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011, 690121.
- Brettschneider, J., Claus, A., Kassubek, J., and Tumani, H. (2005). Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. *J. Neurol.* 252, 1067–1073.
- Broadwell, R.D., and Salzman, M. (1981). Expanding the definition of the blood-brain barrier to protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7820–7824.
- Broccardo, C., Luciani, M., and Chimini, G. (1999). The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 395–404.
- Bronge, L., and Wahlund, L.O. (2000). White matter lesions in dementia: an MRI study on blood-brain barrier dysfunction. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 11, 263–267.
- Brookmeyer, R., Gray, S., and Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am. J. Public Health* 88, 1337–1342.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O., et al. (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* 22, 336–345.
- Brouillette, J., Caillierez, R., Zommer, N., Alves-Pires, C., Benilova, I., Blum, D., De Strooper, B., and Buée, L. (2012). Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid-β1-42 oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 7852–7861.
- Brown, W.R. (2010). A review of string vessels or collapsed, empty basement membrane tubes. *J. Alzheimers Dis. JAD* 21, 725–739.
- Brown, R.C., and Davis, T.P. (2002). Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke* 33, 1706–1711.
- Brown, W.R., and Thore, C.R. (2011). Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37, 56–74.

- Brown, W.R., Moody, D.M., Thore, C.R., and Challa, V.R. (2000). Cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease and leukoaraiosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 903, 39–45.
- Brown, W.R., Moody, D.M., Thore, C.R., Challa, V.R., and Anstrom, J.A. (2007). Vascular dementia in leukoaraiosis may be a consequence of capillary loss not only in the lesions, but in normal-appearing white matter and cortex as well. *J. Neurol. Sci.* 257, 62–66.
- Brureau, A., Blanchard-Bregeon, V., Pech, C., Hamon, S., Chaillou, P., Guillemot, J.-C., Barneoud, P., Bertrand, P., Pradier, L., Rooney, T., et al. (2017). NF-L in cerebrospinal fluid and serum is a biomarker of neuronal damage in an inducible mouse model of neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 104, 73–84.
- Bu, G. (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 333–344.
- Buée, L., Hof, P.R., Bouras, C., Delacourte, A., Perl, D.P., Morrison, J.H., and Fillit, H.M. (1994). Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 87, 469–480.
- Buée-Scherrer, V., and Goedert, M. (2002). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases in intact cells. *FEBS Lett.* 515, 151–154.
- Burns, M.P., Vardanian, L., Pajooesh-Ganji, A., Wang, L., Cooper, M., Harris, D.C., Duff, K., and Rebeck, G.W. (2006). The effects of ABCA1 on cholesterol efflux and Abeta levels in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 98, 792–800.
- Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostensfeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23, 297–308.
- Butterfield, D.A., and Poon, H.F. (2005). The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): A model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 40, 774–783.
- Caccamo, A., Oddo, S., Sugarman, M.C., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2005). Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiol. Aging* 26, 645–654.
- Cai, Z., Liu, N., Wang, C., Qin, B., Zhou, Y., Xiao, M., Chang, L., Yan, L.-J., and Zhao, B. (2016). Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 483–495.
- Caillé, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., and Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Dev. Camb. Engl.* 131, 2173–2181.
- Calhoun, M.E., Wiederhold, K.H., Abramowski, D., Phinney, A.L., Probst, A., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., and Jucker, M. (1998). Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* 395, 755–756.
- Campos-Bedolla, P., Walter, F.R., Veszelka, S., and Deli, M.A. (2014). Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch. Med. Res.* 45, 610–638.
- Candela, P., Gosselet, F., Miller, F., Buee-Scherrer, V., Torpier, G., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2008). Physiological pathway for low-density lipoproteins across the blood-brain barrier: transcytosis through brain capillary endothelial cells in vitro. *Endothel. J. Endothel. Cell Res.* 15, 254–264.
- Candela, P., Gosselet, F., Saint-Pol, J., Sevin, E., Boucau, M.-C., Boulanger, E., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2010). Apical-to-basolateral transport of amyloid- β peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein. *J. Alzheimers Dis. JAD* 22, 849–859.
- Candela, P., Saint-Pol, J., Kuntz, M., Boucau, M.-C., Lamartiniere, Y., Gosselet, F., and Fenart, L. (2015). In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res.* 1594, 15–26.

- Cantin, S., Villien, M., Moreaud, O., Tropres, I., Keignart, S., Chipon, E., Le Bas, J.-F., Warnking, J., and Krainik, A. (2011). Impaired cerebral vasoreactivity to CO₂ in Alzheimer's disease using BOLD fMRI. *NeuroImage* 58, 579–587.
- Carpentier, M., Robitaille, Y., DesGroseillers, L., Boileau, G., and Marcinkiewicz, M. (2002). Declining expression of neprilysin in Alzheimer disease vasculature: possible involvement in cerebral amyloid angiopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 849–856.
- Carrano, A., Hoozemans, J.J.M., van der Vies, S.M., Rozemuller, A.J.M., van Horssen, J., and de Vries, H.E. (2011). Amyloid Beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1167–1178.
- Casas, C., Sergeant, N., Itier, J.-M., Blanchard, V., Wirths, O., van der Kolk, N., Vingtdeux, V., van de Steeg, E., Ret, G., Canton, T., et al. (2004). Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am. J. Pathol.* 165, 1289–1300.
- Caserta, M.T., Caccioppo, D., Lapin, G.D., Ragin, A., and Groothuis, D.R. (1998). Blood-brain barrier integrity in Alzheimer's disease patients and elderly control subjects. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 10, 78–84.
- Cattelotte, J., André, P., Ouellet, M., Bourasset, F., Scherrmann, J.-M., and Cisternino, S. (2008). In situ mouse carotid perfusion model: glucose and cholesterol transport in the eye and brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1449–1459.
- Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L., and von Eckardstein, A. (2006). Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 655–666.
- Cereijido, M., Valdés, J., Shoshani, L., and Contreras, R.G. (1998). Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 161–177.
- Challa, V.R., Thore, C.R., Moody, D.M., Brown, W.R., and Anstrom, J.A. (2002). A three-dimensional study of brain string vessels using celloidin sections stained with anti-collagen antibodies. *J. Neurol. Sci.* 203–204, 165–167.
- Challa, V.R., Thore, C.R., Moody, D.M., Anstrom, J.A., and Brown, W.R. (2004). Increase of white matter string vessels in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 6, 379–383; discussion 443–449.
- Chang, K.-H., Wu, Y.-R., Chen, Y.-C., and Chen, C.-M. (2015). Plasma inflammatory biomarkers for Huntington's disease patients and mouse model. *Brain. Behav. Immun.* 44, 121–127.
- Chang, R.C.C., Wong, A.K.Y., Ng, H.-K., and Hugon, J. (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha (eIF2alpha) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 13, 2429–2432.
- Chang, T.Y., Yamauchi, Y., Hasan, M.T., and Chang, C.C. (2017). Cellular Cholesterol Homeostasis in Alzheimer's Disease. *J. Lipid Res.*
- Chao, L.L., Buckley, S.T., Kornak, J., Schuff, N., Madison, C., Yaffe, K., Miller, B.L., Kramer, J.H., and Weiner, M.W. (2010). ASL perfusion MRI predicts cognitive decline and conversion from MCI to dementia. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 24, 19–27.
- Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V.J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T.V., Hyman, B.T., et al. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* 2, 271–276.
- Chapy, H., André, P., Declèves, X., Scherrmann, J.-M., and Cisternino, S. (2015). A polyspecific drug/proton antiporter mediates diphenhydramine and clonidine transport at the mouse blood-retinal barrier. *Br. J. Pharmacol.* 172, 4714–4725.
- Chapy, H., Saubaméa, B., Tournier, N., Bourasset, F., Behar-Cohen, F., Declèves, X., Scherrmann, J.-M., and Cisternino, S. (2016). Blood-brain and retinal barriers show dissimilar ABC transporter impacts and concealed effect of P-glycoprotein on a novel verapamil influx carrier. *Br. J. Pharmacol.* 173, 497–510.

- Chaves, C., Gómez-Zepeda, D., Auvity, S., Menet, M.-C., Crété, D., Labat, L., Remião, F., Cisternino, S., and Declèves, X. (2016). Effect of Subchronic Intravenous Morphine Infusion and Naloxone-Precipitated Morphine Withdrawal on P-gp and Bcrp at the Rat Blood-Brain Barrier. *J. Pharm. Sci.* *105*, 350–358.
- Chen, R.-L. (2011). Is it appropriate to use albumin CSF/plasma ratio to assess blood brain barrier permeability? *Neurobiol. Aging* *32*, 1338–1339.
- Chen, Z., and Zhong, C. (2013). Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog. Neurobiol.* *108*, 21–43.
- Chen, W.-W., Zhang, X., and Huang, W.-J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol. Med. Rep.* *13*, 3391–3396.
- Chen, Z.J., Vulevic, B., Ile, K.E., Soulika, A., Davis, W., Reiner, P.B., Connop, B.P., Nathwani, P., Trojanowski, J.Q., and Tew, K.D. (2004). Association of ABCA2 expression with determinants of Alzheimer's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 1129–1131.
- Cheung, Z.H., and Ip, N.Y. (2004). Cdk5: mediator of neuronal death and survival. *Neurosci. Lett.* *361*, 47–51.
- Cheung, Z.H., Fu, A.K.Y., and Ip, N.Y. (2006). Synaptic Roles of Cdk5: Implications in Higher Cognitive Functions and Neurodegenerative Diseases. *Neuron* *50*, 13–18.
- Chishti, M.A., Yang, D.S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., et al. (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J. Biol. Chem.* *276*, 21562–21570.
- Chiu, C., Miller, M.C., Monahan, R., Osgood, D.P., Stopa, E.G., and Silverberg, G.D. (2015). P-glycoprotein expression and amyloid accumulation in human aging and Alzheimer's disease: preliminary observations. *Neurobiol. Aging* *36*, 2475–2482.
- Choi, D.W. (1988a). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* *11*, 465–469.
- Choi, D.W. (1988b). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* *1*, 623–634.
- Choi, D.W. (1992). Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* *23*, 1261–1276.
- Chow, V.W., Mattson, M.P., Wong, P.C., and Gleichmann, M. (2010). An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *Neuromolecular Med.* *12*, 1–12.
- Chyung, J.H., Raper, D.M., and Selkoe, D.J. (2005). Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J. Biol. Chem.* *280*, 4383–4392.
- Cipolla, M.J. (2009). *Anatomy and Ultrastructure* (Morgan & Claypool Life Sciences).
- 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., et al. (2005). P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* *115*, 3285–3290.
- Cisternino, S., Rousselle, C., Debray, M., and Scherrmann, J.-M. (2003). In vivo saturation of the transport of vinblastine and colchicine by P-glycoprotein at the rat blood-brain barrier. *Pharm. Res.* *20*, 1607–1611.
- Cisternino, S., Mercier, C., Bourasset, F., Roux, F., and Scherrmann, J.-M. (2004). Expression, Up-Regulation, and Transport Activity of the Multidrug-Resistance Protein Abcg2 at the Mouse Blood-Brain Barrier. *Cancer Res.* *64*, 3296–3301.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D.J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* *360*, 672–674.

- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., et al. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* 3, 67–72.
- Ciuculescu, E.-D., Mekmouche, Y., and Faller, P. (2005). Metal-binding properties of the peptide APP170-188: a model of the ZnII-binding site of amyloid precursor protein (APP). *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 11, 903–909.
- Clarke, P.G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl.)* 181, 195–213.
- Claudio, L. (1996). Ultrastructural features of the blood-brain barrier in biopsy tissue from Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 91, 6–14.
- Cleren, C., Yang, L., Lorenzo, B., Calingasan, N.Y., Schomer, A., Sireci, A., Wille, E.J., and Beal, M.F. (2008). Therapeutic effects of coenzyme Q10 (CoQ10) and reduced CoQ10 in the MPTP model of Parkinsonism. *J. Neurochem.* 104, 1613–1621.
- Colle M-A, null, Hauw J-J, null, Crespeau, F., Uchihara, T., Akiyama, H., Checler, F., Pageat, P., and Duykaerts, C. (2000). Vascular and parenchymal Abeta deposition in the aging dog: correlation with behavior. *Neurobiol. Aging* 21, 695–704.
- Collingridge, G.L., and Lester, R.A. (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 41, 143–210.
- Committee on the Public Health Dimensions of Cognitive Aging, Board on Health Sciences Policy, and Institute of Medicine (2015). *Cognitive Aging: Progress in Understanding and Opportunities for Action* (Washington (DC): National Academies Press (US)).
- Cook, D.G., Leverenz, J.B., McMillan, P.J., Kulstad, J.J., Ericksen, S., Roth, R.A., Schellenberg, G.D., Jin, L.-W., Kovacina, K.S., and Craft, S. (2003). Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am. J. Pathol.* 162, 313–319.
- Cooray, H.C., Blackmore, C.G., Maskell, L., and Barrand, M.A. (2002). Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport* 13, 2059–2063.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., and Bertino, J.R. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 695–698.
- Coria, F., and Rubio, I. (1996). Cerebral amyloid angiopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22, 216–227.
- Coskun, P.E., Beal, M.F., and Wallace, D.C. (2004). Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10726–10731.
- Croop, J.M., Tiller, G.E., Fletcher, J.A., Lux, M.L., Raab, E., Goldenson, D., Son, D., Arciniegas, S., and Wu, R.L. (1997). Isolation and characterization of a mammalian homolog of the Drosophila white gene. *Gene* 185, 77–85.
- Crouch, P.J., Blake, R., Duce, J.A., Ciccotosto, G.D., Li, Q.-X., Barnham, K.J., Curtain, C.C., Cherny, R.A., Cappai, R., Dyrks, T., et al. (2005). Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 672–679.
- Cruz, J.C., Tseng, H.-C., Goldman, J.A., Shih, H., and Tsai, L.-H. (2003). Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40, 471–483.
- Cruz, J.C., Kim, D., Moy, L.Y., Dobbin, M.M., Sun, X., Bronson, R.T., and Tsai, L.-H. (2006). p25/Cyclin-Dependent Kinase 5 Induces Production and Intraneuronal Accumulation of Amyloid β In Vivo. *J. Neurosci.* 26, 10536–10541.

- Cserepes, J., Szentpétery, Z., Seres, L., Ozveg-Laczka, C., Langmann, T., Schmitz, G., Glavinas, H., Klein, I., Homolya, L., Váradi, A., et al. (2004). Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 860–867.
- Cumming, T.B., and Brodtmann, A. (2011). Can stroke cause neurodegenerative dementia? *Int. J. Stroke Off. J. Int. Stroke Soc.* 6, 416–424.
- Cummings, B.J., Head, E., Ruehl, W., Milgram, N.W., and Cotman, C.W. (1996). The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol. Aging* 17, 259–268.
- Dagenais, C., Rousselle, C., Pollack, G.M., and Scherrmann, J.M. (2000). Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 381–386.
- Dagenais, C., Avdeef, A., Tsinman, O., Dudley, A., and Beliveau, R. (2009). P-Glycoprotein Deficient Mouse in situ Blood-Brain Barrier Permeability and its Prediction using an in combo PAMPA Model. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 38, 121.
- Dalkara, T., Gursoy-Ozdemir, Y., and Yemisci, M. (2011). Brain microvascular pericytes in health and disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 122, 1–9.
- Dallas, S., Miller, D.S., and Bendayan, R. (2006). Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 58, 140–161.
- Dalrymple, A., Wild, E.J., Joubert, R., Sathasivam, K., Björkqvist, M., Petersén, A., Jackson, G.S., Isaacs, J.D., Kristiansen, M., Bates, G.P., et al. (2007). Proteomic profiling of plasma in Huntington's disease reveals neuroinflammatory activation and biomarker candidates. *J. Proteome Res.* 6, 2833–2840.
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A.A., and Barres, B.A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468, 562–566.
- Danielyan, L., Klein, R., Hanson, L.R., Buadze, M., Schwab, M., Gleiter, C.H., and Frey, W.H. (2010). Protective effects of intranasal losartan in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Rejuvenation Res.* 13, 195–201.
- Dasari, B., Prasanthi, J.R.P., Marwarha, G., Singh, B.B., and Ghribi, O. (2010). The oxysterol 27-hydroxycholesterol increases β -amyloid and oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *BMC Ophthalmol.* 10, 22.
- Dauchy, S., Dutheil, F., Weaver, R.J., Chassoux, F., Dumas-Duport, C., Couraud, P.-O., Scherrmann, J.-M., De Waziers, I., and Declèves, X. (2008). ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood–brain barrier. *J. Neurochem.* 107, 1518–1528.
- Davis, W. (2010). The ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) increases endogenous amyloid precursor protein expression and A β fragment generation. *Curr. Alzheimer Res.* 7, 566–577.
- Davis, W. (2011). The ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) regulates cholesterol homeostasis and low-density lipoprotein receptor metabolism in N2a neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 1152–1164.
- Davis, W. (2015). The ATP-Binding Cassette Transporter-2 (ABCA2) Overexpression Modulates Sphingosine Levels and Transcription of the Amyloid Precursor Protein (APP) Gene. *Curr. Alzheimer Res.* 12, 847–859.
- De Strooper, B., and Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 11), 1857–1870.
- Dean, M., Rzhetsky, A., and Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11, 1156–1166.
- Deane, R., Du Yan, S., Subramanyam, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., et al. (2003). RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.* 9, 907–913.
- Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du Yan, S., Hamm, K., Xu, F., Parisi, M., LaRue, B., Hu, H.W., et al. (2004a). LRP/Amyloid β -Peptide Interaction Mediates Differential Brain Efflux of A β Isoforms. *Neuron* 43, 333–344.

- Deane, R., Wu, Z., and Zlokovic, B.V. (2004b). RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* 35, 2628–2631.
- Deane, R., Bell, R.D., Sagare, A., and Zlokovic, B.V. (2009). Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 8, 16–30.
- Delacourte, A., David, J.P., Sergeant, N., Buée, L., Wattez, A., Vermersch, P., Ghzali, F., Fallet-Bianco, C., Pasquier, F., Lebert, F., et al. (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52, 1158–1165.
- Demeule, M., Régina, A., Jodoin, J., Laplante, A., Dagenais, C., Berthelet, F., Moghrabi, A., and Béliveau, R. (2002). Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascul. Pharmacol.* 38, 339–348.
- Dever, T.E., and Hinnebusch, A.G. (2005). GCN2 whets the appetite for amino acids. *Mol. Cell* 18, 141–142.
- Devraj, K., Klinger, M.E., Myers, R.L., Mokashi, A., Hawkins, R.A., and Simpson, I.A. (2011). GLUT-1 glucose transporters in the blood-brain barrier: differential phosphorylation. *J. Neurosci. Res.* 89, 1913–1925.
- Di Paolo, G., and Kim, T.-W. (2011). Linking Lipids to Alzheimer's Disease: Cholesterol and Beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 284–296.
- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Madrid, J.F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., Martín-Vasallo, P., and Díaz-Flores, L. (2009). Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol. Histopathol.* 24, 909–969.
- Dickson, T.C., and Vickers, J.C. (2001). The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 105, 99–107.
- Dickstein, D.L., Walsh, J., Brautigam, H., Stockton, S.D., Gandy, S., and Hof, P.R. (2010). Role of vascular risk factors and vascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 77, 82–102.
- Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2001). Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 105–112.
- DiMauro, S., and Schon, E.A. (2008). Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 91–123.
- Dineley, K.T., Xia, X., Bui, D., Sweatt, J.D., and Zheng, H. (2002). Accelerated Plaque Accumulation, Associative Learning Deficits, and Up-regulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Protein in Transgenic Mice Co-expressing Mutant Human Presenilin 1 and Amyloid Precursor Proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 22768–22780.
- Do, T.M., Ouellet, M., Calon, F., Chimini, G., Chacun, H., Farinotti, R., and Bourasset, F. (2011). Direct evidence of abca1-mediated efflux of cholesterol at the mouse blood-brain barrier. *Mol. Cell. Biochem.* 357, 397–404.
- Do, T.M., Noel-Hudson, M.-S., Ribes, S., Besengez, C., Smirnova, M., Cisternino, S., Buyse, M., Calon, F., Chimini, G., Chacun, H., et al. (2012). ABCG2- and ABCG4-mediated efflux of amyloid- β peptide 1-40 at the mouse blood-brain barrier. *J. Alzheimers Dis. JAD* 30, 155–166.
- Do, T.M., Bedussi, B., Chasseigneaux, S., Dodacki, A., Yap, C., Chacun, H., Scherrmann, J.-M., Farinotti, R., and Bourasset, F. (2013). Oatp1a4 and an L-thyroxine-sensitive transporter mediate the mouse blood-brain barrier transport of amyloid- β peptide. *J. Alzheimers Dis. JAD* 36, 555–561.
- Do, T.M., Alata, W., Dodacki, A., Traversy, M.-T., Chacun, H., Pradier, L., Scherrmann, J.-M., Farinotti, R., Calon, F., and Bourasset, F. (2014). Altered cerebral vascular volumes and solute transport at the blood-brain barriers of two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 81, 311–317.
- Do, T.M., Dodacki, A., Alata, W., Calon, F., Nicolic, S., Scherrmann, J.-M., Farinotti, R., and Bourasset, F. (2016). Age-Dependent Regulation of the Blood-Brain Barrier Influx/Efflux Equilibrium of Amyloid- β Peptide in a Mouse Model of Alzheimer's Disease (3xTg-AD). *J. Alzheimers Dis. JAD* 49, 287–300.

- Dodacki, A., Wortman, M., Saubaméa, B., Chasseigneaux, S., Nicolic, S., Prince, N., Lochus, M., Raveu, A.-L., Declèves, X., Scherrmann, J.-M., et al. (2017). Expression and function of Abcg4 in the mouse blood-brain barrier: role in restricting the brain entry of amyloid- β peptide. *Sci. Rep.* 7, 13393.
- Dodart, J.-C., and May, P. (2005). Overview on rodent models of Alzheimer's disease. *Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 9*, Unit 9.22.
- Donahue, J.E., Flaherty, S.L., Johanson, C.E., Duncan, J.A., Silverberg, G.D., Miller, M.C., Tavares, R., Yang, W., Wu, Q., Sabo, E., et al. (2006). RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 112, 405–415.
- Douglas, P.M., and Dillin, A. (2010). Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *J. Cell Biol.* 190, 719–729.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., and Ross, D.D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15665–15670.
- Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., and Kirschner, M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell* 3, 1141–1154.
- Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Döring, F., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Goris, J., Dorée, M., and Mandelkow, E. (1992). Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.* 11, 2131–2138.
- Drion, N., Lemaire, M., Lefauconnier, J.M., and Scherrmann, J.M. (1996). Role of P-glycoprotein in the blood-brain transport of colchicine and vinblastine. *J. Neurochem.* 67, 1688–1693.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., et al. (1996). Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383, 710–713.
- Dulubova, I., Ho, A., Huryeva, I., Südhof, T.C., and Rizo, J. (2004). Three-dimensional structure of an independently folded extracellular domain of human amyloid-beta precursor protein. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 9583–9588.
- Dumurgier, J., Mouton-Liger, F., Lapalus, P., Prevot, M., Laplanche, J.-L., Hugon, J., Paquet, C., and Groupe d'Investigation du Liquide Céphalorachidien (GIL) Study Network (2013). Cerebrospinal fluid PKR level predicts cognitive decline in Alzheimer's disease. *PLoS One* 8, e53587.
- den Dunnen, W.F.A., Brouwer, W.H., Bijlard, E., Kamphuis, J., van Linschoten, K., Eggens-Meijer, E., and Holstege, G. (2008). No disease in the brain of a 115-year-old woman. *Neurobiol. Aging* 29, 1127–1132.
- Duyckaerts, C., Potier, M.-C., and Delatour, B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 115, 5–38.
- Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 118, 5–36.
- Dyrna, F., Hanske, S., Krueger, M., and Bechmann, I. (2013). The Blood-Brain Barrier. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8, 763–773.
- Dysken, M.W., Nelson, M.J., Hoover, K.M., Kuskowski, M., and McGeachie, R. (1990). Rapid dynamic CT scanning in primary degenerative dementia and age-matched controls. *Biol. Psychiatry* 28, 425–434.
- Ebert, and Kirch (1998). Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur. J. Clin. Invest.* 28, 944–949.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., and Vestweber, D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J. Cell Sci.* 117, 19–29.
- Eckman, E.A., Adams, S.K., Troendle, F.J., Stodola, B.A., Kahn, M.A., Fauq, A.H., Xiao, H.D., Bernstein, K.E., and Eckman, C.B. (2006). Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 281, 30471–30478.

- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 160, 113–123.
- Ehrlich, P. (1885). *Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus : eine farbenanalytische Studie.* (Berlin: Hirschwald).
- Ehrlich, P. (1910). *Studies in immunity* (New York, John Wiley & Sons).
- Eimer, W.A., and Vassar, R. (2013). Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A β 42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol. Neurodegener.* 8, 2.
- Eisenblätter, T., and Galla, H.-J. (2002). A new multidrug resistance protein at the blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1273–1278.
- Elder, G.A., Gama Sosa, M.A., De Gasperi, R., Dickstein, D.L., and Hof, P.R. (2010). Presenilin transgenic mice as models of Alzheimer's disease. *Brain Struct. Funct.* 214, 127–143.
- Elovaara, I., Icen, A., Palo, J., and Erkinjuntti, T. (1985). CSF in Alzheimer's disease. Studies on blood-brain barrier function and intrathecal protein synthesis. *J. Neurol. Sci.* 70, 73–80.
- Emonard, H., Théret, L., Bennisroune, A.H., and Dedieu, S. (2014). Regulation of LRP-1 expression: make the point. *Pathol. Biol. (Paris)* 62, 84–90.
- Erbsloh, F., Bernsmeier, A., and Hillesheim, H. (1958). [The glucose consumption of the brain & its dependence on the liver]. *Arch. Psychiatr. Nervenkrankh. Ver. Mit Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* 196, 611–626.
- Erdös, E.G., and Skidgel, R.A. (1989). Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 3, 145–151.
- Erickson, M.A., and Banks, W.A. (2013). Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1500–1513.
- Erkkinen, M.G., Kim, M.-O., and Geschwind, M.D. (2017). *Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases.* Cold Spring Harb. Perspect. Biol.
- Evans, D.A., Funkenstein, H.H., Albert, M.S., Scherr, P.A., Cook, N.R., Chown, M.J., Hebert, L.E., Hennekens, C.H., and Taylor, J.O. (1989). Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* 262, 2551–2556.
- Evin, G., and Weidemann, A. (2002). Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* 23, 1285–1297.
- Fahrenholz, F. (2007). Alpha-secretase as a therapeutic target. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 412–417.
- Fan, J., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2017). Cell Death Mechanisms of Neurodegeneration. *Adv. Neurobiol.* 15, 403–425.
- Farkas, E., and Luiten, P.G.M. (2001). Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 64, 575–611.
- Farkas, E., De Jong, G.I., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., and Luiten, P.G. (2000a). Pathological features of cerebral cortical capillaries are doubled in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 100, 395–402.
- Farkas, E., De Jong, G.I., Apró, E., De Vos, R.A., Steur, E.N., and Luiten, P.G. (2000b). Similar ultrastructural breakdown of cerebrocortical capillaries in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and experimental hypertension. What is the functional link? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 903, 72–82.
- Farkas, E., de Vos, R.A.I., Donka, G., Jansen Steur, E.N., Mihály, A., and Luiten, P.G.M. (2006). Age-related microvascular degeneration in the human cerebral periventricular white matter. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 111, 150–157.
- Farrall, A.J., and Wardlaw, J.M. (2009). Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease--systematic review and meta-analysis. *Neurobiol. Aging* 30, 337–352.

- Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., and van Duijn, C.M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278, 1349–1356.
- Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E.A., Frosch, M.P., Eckman, C.B., Tanzi, R.E., Selkoe, D.J., and Guenette, S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4162–4167.
- Farris, W., Schütz, S.G., Cirrito, J.R., Shankar, G.M., Sun, X., George, A., Leissring, M.A., Walsh, D.M., Qiu, W.Q., Holtzman, D.M., et al. (2007). Loss of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy. *Am. J. Pathol.* 171, 241–251.
- Feddermann-Demont, N., Junge, A., Weber, K.P., Weller, M., Dvořák, J., and Tarnutzer, A.A. (2017). Prevalence of potential sports-associated risk factors in Swiss amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Behav.* 7, e00630.
- Ferrante, R.J., Andreassen, O.A., Dedeoglu, A., Ferrante, K.L., Jenkins, B.G., Hersch, S.M., and Beal, M.F. (2002). Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1592–1599.
- de Figueiredo, R.J., Oten, R., Su, J., and Cotman, C.W. (1997). Amyloid deposition in cerebrovascular angiopathy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 826, 463–471.
- Filiano, A.J., Gadani, S.P., and Kipnis, J. (2015). Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Res.* 1617, 18–27.
- Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 477–513.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Pang, P.T., Lu, B., and Tsai, L.-H. (2005). Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory. *Neuron* 48, 825–838.
- Fischer, V.W., Siddiqi, A., and Yusufaly, Y. (1990). Altered angioarchitecture in selected areas of brains with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 79, 672–679.
- Fitz, N.F., Cronican, A., Pham, T., Fogg, A., Fauq, A.H., Chapman, R., Lefterov, I., and Koldamova, R. (2010). Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 6862–6872.
- Fitz, N.F., Cronican, A.A., Saleem, M., Fauq, A.H., Chapman, R., Lefterov, I., and Koldamova, R. (2012). Abca1 deficiency affects Alzheimer's disease-like phenotype in human ApoE4 but not in ApoE3-targeted replacement mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 13125–13136.
- da Fonseca, A.C.C., Matias, D., Garcia, C., Amaral, R., Geraldo, L.H., Freitas, C., and Lima, F.R.S. (2014). The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 362.
- Forette, F., Seux, M.L., Staessen, J.A., Thijs, L., Birkenhäger, W.H., Babarskiene, M.R., Babeanu, S., Bossini, A., Gil-Extremiera, B., Girerd, X., et al. (1998). Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial. *Lancet Lond. Engl.* 352, 1347–1351.
- Forman, M.S., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2004). Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat. Med.* 10, 1055–1063.
- Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S., and Orlandini, S.Z. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell. Physiol.* 182, 41–49.
- Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem. Cell Biol.* 130, 55–70.

- Freeman, L.R., and Keller, J.N. (2012). Oxidative Stress and Cerebral Endothelial Cells: Regulation of the Blood-Brain-Barrier and Antioxidant Based Interventions. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 822.
- Frölich, L., Kornhuber, J., Ihl, R., Fritze, J., Maurer, K., and Riederer, P. (1991). Integrity of the blood-CSF barrier in dementia of Alzheimer type: CSF/serum ratios of albumin and IgG. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 240, 363–366.
- Fukumoto, H., Cheung, B.S., Hyman, B.T., and Irizarry, M.C. (2002). Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 59, 1381–1389.
- Furukawa, K., and Mattson, M.P. (1998). Secreted amyloid precursor protein alpha selectively suppresses N-methyl-D-aspartate currents in hippocampal neurons: involvement of cyclic GMP. *Neuroscience* 83, 429–438.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777–1788.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 143, 391–401.
- Galea, I., Bechmann, I., and Perry, V.H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 28, 12–18.
- Gallez, C. (2005). Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées [en ligne]<<http://www.ladocumentationfrancaise.fr/rapports-publics/054000497/index.shtml>>, consulté le 03-08-2017. (Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé, Bibliothèque des rapports publiques).
- Games, D., Khan, K.M., Soriano, F.G., Keim, P.S., Davis, D.L., Bryant, K., and Lieberburg, I. (1992). Lack of Alzheimer pathology after beta-amyloid protein injections in rat brain. *Neurobiol. Aging* 13, 569–576.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., and Gillespie, F. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523–527.
- Gao, B., Vavricka, S.R., Meier, P.J., and Stieger, B. (2015). Differential cellular expression of organic anion transporting peptides OATP1A2 and OATP2B1 in the human retina and brain: implications for carrier-mediated transport of neuropeptides and neurosteroids in the CNS. *Pflugers Arch.* 467, 1481–1493.
- Gao, Y., Sartori, D.J., Li, C., Yu, Q.-C., Kushner, J.A., Simon, M.C., and Diehl, J.A. (2012). PERK is required in the adult pancreas and is essential for maintenance of glucose homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 32, 5129–5139.
- Garcia-Alloza, M., Robbins, E.M., Zhang-Nunes, S.X., Purcell, S.M., Betensky, R.A., Raju, S., Prada, C., Greenberg, S.M., Bacskai, B.J., and Frosch, M.P. (2006). Characterization of amyloid deposition in the APP^{swE}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* 24, 516–524.
- Gearing, M., Tigges, J., Mori, H., and Mirra, S.S. (1997). β -Amyloid (A β) Deposition in the Brains of Aged Orangutans. *Neurobiol. Aging* 18, 139–146.
- Geerts, H. (2009). Of mice and men: bridging the translational disconnect in CNS drug discovery. *CNS Drugs* 23, 915–926.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., and Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 20, 269–287.
- van Gelder, B.M., Buijsse, B., Tijhuis, M., Kalmijn, S., Giampaoli, S., Nissinen, A., and Kromhout, D. (2007). Coffee consumption is inversely associated with cognitive decline in elderly European men: the FINE Study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61, 226–232.
- Gerhart, D.Z., Broderius, M.A., Borson, N.D., and Drewes, L.R. (1992). Neurons and microvessels express the brain glucose transporter protein GLUT3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 733–737.
- Gerson, J.E., Mudher, A., and Kaye, R. (2016). Potential mechanisms and implications for the formation of tau oligomeric strains. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 51, 482–496.

- Ghribi, O., Larsen, B., Schrag, M., and Herman, M.M. (2006). High cholesterol content in neurons increases BACE, beta-amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. *Exp. Neurol.* 200, 460–467.
- Giri, N., Agarwal, S., Shaik, N., Pan, G., Chen, Y., and Elmquist, W.F. (2009). Substrate-Dependent Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2)-Mediated Interactions: Consideration of Multiple Binding Sites in in Vitro Assay Design. *Drug Metab. Dispos.* 37, 560.
- Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., and Gage, F.H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140, 918–934.
- Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885–890.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., and James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Cairns, N.J., and Crowther, R.A. (1992). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159–168.
- Goldman, J.S., Hahn, S.E., Catania, J.W., LaRusse-Eckert, S., Butson, M.B., Rumbaugh, M., Strecker, M.N., Roberts, J.S., Burke, W., Mayeux, R., et al. (2011). Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 13, 597–605.
- Goldmann, E. (1909). Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der 'vitalen Färbung.' *Beiträg Klin. Chir.* 64, 192–265.
- Goldmann, E. (1913). Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Beitrag zur Physio- Pathologie des plexus chorioideus und der Hirnhäute. *Abh Preuss Akad Wiss Phys-Math Kl* 1, 1–60.
- Gong, C.X., Singh, T.J., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 61, 921–927.
- Gong, C.X., Shaikh, S., Wang, J.Z., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1995). Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 65, 732–738.
- González, H., Elgueta, D., Montoya, A., and Pacheco, R. (2014). Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J. Neuroimmunol.* 274, 1–13.
- González-Marrero, I., Giménez-Llort, L., Johanson, C.E., Carmona-Calero, E.M., Castañeyra-Ruiz, L., Brito-Armas, J.M., Castañeyra-Perdomo, A., and Castro-Fuentes, R. (2015). Choroid plexus dysfunction impairs beta-amyloid clearance in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 17.
- Goodenough, D.A., Goliger, J.A., and Paul, D.L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 475–502.
- Goodman, Y., and Mattson, M.P. (1994). Secreted Forms of β -Amyloid Precursor Protein Protect Hippocampal Neurons against Amyloid β -Peptide-Induced Oxidative Injury. *Exp. Neurol.* 128, 1–12.
- Gosselet, F., Candela, P., Sevin, E., Berezowski, V., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2009). Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an in vitro model. *Brain Res.* 1249, 34–42.
- Gosselet, F., Saint-Pol, J., and Fenart, L. (2014). Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: implications for Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 687–691.
- Götz, J., and Ittner, L.M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 532–544.
- Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* 293, 1491–1495.

Gouvernement.fr Le plan maladies neuro-dégénératives 2014-2019 | Gouvernement.fr [en ligne]. <<http://www.gouvernement.fr/action/le-plan-maladies-neuro-degeneratives-2014-2019>>, consulté le 21-07-2017.

Graff, C.L., and Pollack, G.M. (2004). Drug transport at the blood-brain barrier and the choroid plexus. *Curr. Drug Metab.* 5, 95–108.

Grateau, G. (1992). Les amyloses héréditaires. *Médecine/Sciences* 6, 524–3.

Gray, J.A., and McNaughton, N. (1983). Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 7, 119–188.

Green, R.C., Cupples, L.A., Go, R., Benke, K.S., Edeki, T., Griffith, P.A., Williams, M., Hipps, Y., Graff-Radford, N., Bachman, D., et al. (2002). Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 287, 329–336.

Greenberg, S.M., Qiu, W.Q., Selkoe, D.J., Ben-Itzhak, A., and Kosik, K.S. (1995). Amino-terminal region of the beta-amyloid precursor protein activates mitogen-activated protein kinase. *Neurosci. Lett.* 198, 52–56.

Greenberg, S.M., Gurol, M.E., Rosand, J., and Smith, E.E. (2004). Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. *Stroke* 35, 2616–2619.

Grimm, M.O.W., Grimm, H.S., Tomic, I., Beyreuther, K., Hartmann, T., and Bergmann, C. (2008). Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J. Biol. Chem.* 283, 11302–11311.

Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S.K., Younkin, S., et al. (2013). TREM2 Variants in Alzheimer’s Disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 117–127.

Guillozet, A.L., Weintraub, S., Mash, D.C., and Mesulam, M.M. (2003). Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* 60, 729–736.

Guo, F., and Cavener, D.R. (2007). The GCN2 eIF2 α kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell Metab.* 5, 103–114.

Guo, J.L., and Lee, V.M.Y. (2014). Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat. Med.* 20, 130–138.

Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1994). Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry (Mosc.)* 33, 9511–9522.

Haag, M.D.M., Hofman, A., Koudstaal, P.J., Stricker, B.H.C., and Breteler, M.M.B. (2009). Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80, 13–17.

van de Haar, H.J., Burgmans, S., Hofman, P.A.M., Verhey, F.R.J., Jansen, J.F.A., and Backes, W.H. (2015). Blood-brain barrier impairment in dementia: current and future in vivo assessments. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 49, 71–81.

van de Haar, H.J., Burgmans, S., Jansen, J.F.A., van Osch, M.J.P., van Buchem, M.A., Muller, M., Hofman, P.A.M., Verhey, F.R.J., and Backes, W.H. (2016a). Blood-Brain Barrier Leakage in Patients with Early Alzheimer Disease. *Radiology* 281, 527–535.

van de Haar, H.J., Jansen, J.F.A., van Osch, M.J.P., van Buchem, M.A., Muller, M., Wong, S.M., Hofman, P.A.M., Burgmans, S., Verhey, F.R.J., and Backes, W.H. (2016b). Neurovascular unit impairment in early Alzheimer’s disease measured with magnetic resonance imaging. *Neurobiol. Aging* 45, 190–196.

Haass, C., Hung, A.Y., Selkoe, D.J., and Teplow, D.B. (1994). Mutations associated with a locus for familial Alzheimer’s disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J. Biol. Chem.* 269, 17741–17748.

Hagenbuch, B., and Meier, P.J. (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1609, 1–18.

- Hagenbuch, B., and Meier, P.J. (2004). Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.* **447**, 653–665.
- Hall, A.M., and Roberson, E.D. (2012). Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* **88**, 3–12.
- Halliday, M.R., Rege, S.V., Ma, Q., Zhao, Z., Miller, C.A., Winkler, E.A., and Zlokovic, B.V. (2016). Accelerated pericyte degeneration and blood-brain barrier breakdown in apolipoprotein E4 carriers with Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 216–227.
- Hammarlund-Udenaes, M., Paalzow, L.K., and de Lange, E.C. (1997). Drug equilibration across the blood-brain barrier--pharmacokinetic considerations based on the microdialysis method. *Pharm. Res.* **14**, 128–134.
- Han, A.-P., Yu, C., Lu, L., Fujiwara, Y., Browne, C., Chin, G., Fleming, M., Leboulch, P., Orkin, S.H., and Chen, J.-J. (2001). Heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J.* **20**, 6909–6918.
- Han, W., Ji, T., Mei, B., and Su, J. (2011). Peptide p3 may play a neuroprotective role in the brain. *Med. Hypotheses* **76**, 543–546.
- Hanyu, H., Sato, T., Hirao, K., Kanetaka, H., Iwamoto, T., and Koizumi, K. (2010). The progression of cognitive deterioration and regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease: a longitudinal SPECT study. *J. Neurol. Sci.* **290**, 96–101.
- Harada, H., Tamaoka, A., Ishii, K., Shoji, S., Kametaka, S., Kametani, F., Saito, Y., and Murayama, S. (2006). Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) is increased in remaining neurons in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Res.* **54**, 24–29.
- Harada, R., Okamura, N., Furumoto, S., Furukawa, K., Ishiki, A., Tomita, N., Hiraoka, K., Watanuki, S., Shidahara, M., Miyake, M., et al. (2015). [(18)F]THK-5117 PET for assessing neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **42**, 1052–1061.
- Hardy, J. (1992). Framing beta-amyloid. *Nat. Genet.* **1**, 233–234.
- Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184–185.
- Hardy, J.A., Mann, D.M., Wester, P., and Winblad, B. (1986). An integrative hypothesis concerning the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **7**, 489–502.
- Harik, S.I., and Kalaria, R.N. (1991). Blood-brain barrier abnormalities in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **640**, 47–52.
- Harkany, T., O'Mahony, S., Kelly, J.P., Soós, K., Törő, I., Penke, B., Luiten, P.G., Nyakas, C., Gulya, K., and Leonard, B.E. (1998). Beta-amyloid(Phe(SO₃H)₂₄)₂₅₋₃₅ in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation. *Behav. Brain Res.* **90**, 133–145.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvina, V., Dowzell, K., Williams, A., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **41**, 1088–1093.
- Harr, S.D., Simonian, N.A., and Hyman, B.T. (1995). Functional alterations in Alzheimer's disease: decreased glucose transporter 3 immunoreactivity in the perforant pathway terminal zone. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **54**, 38–41.
- Harrison, F.E., and May, J.M. (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 719–730.
- Harrison, O.J., Jin, X., Hong, S., Bahna, F., Ahlsen, G., Brasch, J., Wu, Y., Vendome, J., Felsovalyi, K., Hampton, C.M., et al. (2011). The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. *Struct. Lond. Engl.* **19**, 244–256.
- Hartl, F.U. (2017). Protein Misfolding Diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 21–26.

- Hartz, A.M.S., Miller, D.S., and Bauer, B. (2010). Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Pharmacol.* **77**, 715–723.
- Haseloff, R.F., Blasig, I.E., Bauer, H.C., and Bauer, H. (2005). In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell. Mol. Neurobiol.* **25**, 25–39.
- Hauss-Wegrzyniak, B., Vraniak, P., and Wenk, G.L. (1999). The effects of a novel NSAID on chronic neuroinflammation are age dependent. *Neurobiol. Aging* **20**, 305–313.
- Hawkins, B.T., and Davis, T.P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* **57**, 173–185.
- Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Yamashita, J., and Yamamoto, H. (1997). Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* **19**, 13–26.
- Head, B.P., Peart, J.N., Panneerselvam, M., Yokoyama, T., Pearn, M.L., Niesman, I.R., Bonds, J.A., Schilling, J.M., Miyanohara, A., Headrick, J., et al. (2010). Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging. *PLoS One* **5**, e15697.
- Hediger, M.A., Cl  men  on, B., Burrier, R.E., and Bruford, E.A. (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol. Aspects Med.* **34**, 95–107.
- Helisalmi, S., Hiltunen, M., Veps  l  inen, S., Iivonen, S., Mannermaa, A., Lehtovirta, M., Koivisto, A.M., Alafuzoff, I., and Soininen, H. (2004). Polymorphisms in neprilysin gene affect the risk of Alzheimer's disease in Finnish patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **75**, 1746–1748.
- Hellstr  m-Lindahl, E., Ravid, R., and Nordberg, A. (2008). Age-dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: Inverse correlation with A   levels. *Neurobiol. Aging* **29**, 210–221.
- Henderson, A.S., East  al, S., Jorm, A.F., Mackinnon, A.J., Korten, A.E., Christensen, H., Croft, L., and Jacomb, P.A. (1995). Apolipoprotein E allele epsilon 4, dementia, and cognitive decline in a population sample. *Lancet Lond. Engl.* **346**, 1387–1390.
- Heneka, M.T., Carson, M.J., El Khoury, J., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., et al. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **14**, 388–405.
- Herrup, K. (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat. Neurosci.* **18**, 794–799.
- Herv  , F., Ghinea, N., and Scherrmann, J.-M. (2008). CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J.* **10**, 455–472.
- Hetz, C., and Saxena, S. (2017). ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurol.*
- Heyman, A., Fillenbaum, G.G., Welsh-Bohmer, K.A., Gearing, M., Mirra, S.S., Mohs, R.C., Peterson, B.L., and Pieper, C.F. (1998). Cerebral infarcts in patients with autopsy-proven Alzheimer's disease: CERAD, part XVIII. Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease. *Neurology* **51**, 159–162.
- Higgins, C.F., and Linton, K.J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 918–926.
- Hipp, M.S., Park, S.-H., and Hartl, F.U. (2014). Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol.* **24**, 506–514.
- Hirao, K., Ohnishi, T., Hirata, Y., Yamashita, F., Mori, T., Moriguchi, Y., Matsuda, H., Nemoto, K., Imabayashi, E., Yamada, M., et al. (2005). The prediction of rapid conversion to Alzheimer's disease in mild cognitive impairment using regional cerebral blood flow SPECT. *NeuroImage* **28**, 1014–1021.
- Hirsch-Reinshagen, V., Maia, L.F., Burgess, B.L., Blain, J.-F., Naus, K.E., McIsaac, S.A., Parkinson, P.F., Chan, J.Y., Tansley, G.H., Hayden, M.R., et al. (2005). The absence of ABCA1 decreases soluble ApoE levels but does not diminish amyloid deposition in two murine models of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **280**, 43243–43256.

- Hofman, A., Ott, A., Breteler, M.M., Bots, M.L., Slooter, A.J., van Harskamp, F., van Duijn, C.N., Van Broeckhoven, C., and Grobbee, D.E. (1997). Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet Lond. Engl.* 349, 151–154.
- Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., et al. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat. Med.* 4, 97–100.
- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J.-C., Carrasquillo, M.M., Abraham, R., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvina, V., et al. (2011). Common variants in ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 43, 429–435.
- Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., Jones, R.W., Bullock, R., Love, S., Neal, J.W., et al. (2008). Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet Lond. Engl.* 372, 216–223.
- Hong, S., and Van Kaer, L. (1999). Immune privilege: keeping an eye on natural killer T cells. *J. Exp. Med.* 190, 1197–1200.
- Honig, L.S., Tang, M.-X., Albert, S., Costa, R., Luchsinger, J., Manly, J., Stern, Y., and Mayeux, R. (2003). Stroke and the risk of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 60, 1707–1712.
- Hooijmans, C.R., Rutters, F., Dederen, P.J., Gambarota, G., Veltien, A., van Groen, T., Broersen, L.M., Lütjohann, D., Heerschap, A., Tanila, H., et al. (2007a). Changes in cerebral blood volume and amyloid pathology in aged Alzheimer APP/PS1 mice on a docosahexaenoic acid (DHA) diet or cholesterol enriched Typical Western Diet (TWD). *Neurobiol. Dis.* 28, 16–29.
- Hooijmans, C.R., Graven, C., Dederen, P.J., Tanila, H., van Groen, T., and Kiliaan, A.J. (2007b). Amyloid beta deposition is related to decreased glucose transporter-1 levels and hippocampal atrophy in brains of aged APP/PS1 mice. *Brain Res.* 1181, 93–103.
- Horwood, N., and Davies, D.C. (1994). Immunolabelling of hippocampal microvessel glucose transporter protein is reduced in Alzheimer's disease. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 425, 69–72.
- Howarth, C., Gleeson, P., and Attwell, D. (2012). Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1222–1232.
- Hsia, A.Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G.Q., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Malenka, R.C., Nicoll, R.A., and Mucke, L. (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3228–3233.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99–102.
- Huang, Y., and Mucke, L. (2012). Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell* 148, 1204–1222.
- Huang, S.-M., Mouri, A., Kokubo, H., Nakajima, R., Suemoto, T., Higuchi, M., Staufenbiel, M., Noda, Y., Yamaguchi, H., Nabeshima, T., et al. (2006). Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. *J. Biol. Chem.* 281, 17941–17951.
- Huber, J.D., Egleton, R.D., and Davis, T.P. (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. *Trends Neurosci.* 24, 719–725.
- Huber, J.D., Hau, V.S., Borg, L., Campos, C.R., Egleton, R.D., and Davis, T.P. (2002). Blood-brain barrier tight junctions are altered during a 72-h exposure to lambda-carrageenan-induced inflammatory pain. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H1531–1537.
- Hultman, K., Strickland, S., and Norris, E.H. (2013). The APOE ε4/ε4 genotype potentiates vascular fibrin(ogen) deposition in amyloid-laden vessels in the brains of Alzheimer's disease patients. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1251–1258.

- Hung, S.-Y., and Fu, W.-M. (2017). Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J. Biomed. Sci.* 24, 47.
- Hunt, C.E., and Turner, A.J. (2009). Cell biology, regulation and inhibition of beta-secretase (BACE-1). *FEBS J.* 276, 1845–1859.
- Hunter, C.L., Isacson, O., Nelson, M., Bimonte-Nelson, H., Seo, H., Lin, L., Ford, K., Kindy, M.S., and Granholm, A.-C. (2003). Regional alterations in amyloid precursor protein and nerve growth factor across age in a mouse model of Down's syndrome. *Neurosci. Res.* 45, 437–445.
- Hunter, C.L., Bimonte-Nelson, H.A., Nelson, M., Eckman, C.B., and Granholm, A.-C. (2004). Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer's disease in Ts65Dn mice: effects of estrogen. *Neurobiol. Aging* 25, 873–884.
- Huntington Study Group (2001). A randomized, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 and remacemide in Huntington's disease. *Neurology* 57, 397–404.
- Huntington Study Group (2010). A futility study of minocycline in Huntington's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 25, 2219–2224.
- Huse, J.T., Pijak, D.S., Leslie, G.J., Lee, V.M.-Y., and Doms, R.W. (2000). Maturation and Endosomal Targeting of β -Site Amyloid Precursor Protein-cleaving Enzyme THE ALZHEIMER'S DISEASE β -SECRETASE. *J. Biol. Chem.* 275, 33729–33737.
- Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agnietti, A.L., Donato, R., and Rauvala, H. (2000). Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J. Biol. Chem.* 275, 40096–40105.
- Hyman, B.T. (1992). Down syndrome and Alzheimer disease. *Prog. Clin. Biol. Res.* 379, 123–142.
- Hynd, M.R., Scott, H.L., and Dodd, P.R. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 45, 583–595.
- Iacono, D., Zandi, P., Gross, M., Markesbery, W.R., Pletnikova, O., Rudow, G., and Troncoso, J.C. (2015). APO ϵ 2 and education in cognitively normal older subjects with high levels of AD pathology at autopsy: findings from the Nun Study. *Oncotarget* 6, 14082–14091.
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 347–360.
- Iadecola, C. (2013). The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* 80, 844–866.
- icm-institute.org Maladies - Les chiffres-clés - Institut du Cerveau et de la Moelle épinière. icm-institute.org [en ligne]. <<http://icm-institute.org/fr/chiffres-cles/>>, consulté le 24-07-2017.
- Ikonomidou, C., and Turski, L. (1995). Excitotoxicity and neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurol.* 8, 487–497.
- Iliff, J.J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B.A., Peng, W., Gundersen, G.A., Benveniste, H., Vates, G.E., Deane, R., Goldman, S.A., et al. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci. Transl. Med.* 4, 147ra111.
- Imai, Y., Soda, M., and Takahashi, R. (2000). Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 35661–35664.
- Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., and Hashizume, Y. (2003). Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 106, 518–526.
- invs.santepubliquefrance.fr Maladies Neurodégénératives. Dossiers thématiques/Maladies chroniques et traumatismes/Maladies neurodégénératives. invs.santepubliquefrance.fr [en ligne]. <<http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-chroniques-et-traumatismes/Maladies-neurodegeneratives/Les-maladies-neurodegeneratives>>, consulté le 21-07-2017.

- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., and Grundke-Iqbal, I. (2010). Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr. Alzheimer Res.* 7, 656–664.
- Irizarry, M.C., Soriano, F., McNamara, M., Page, K.J., Schenk, D., Games, D., and Hyman, B.T. (1997). Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 7053–7059.
- Ishii, K. (2014). PET approaches for diagnosis of dementia. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 35, 2030–2038.
- Ito, S., Ohtsuki, S., and Terasaki, T. (2006). Functional characterization of the brain-to-blood efflux clearance of human amyloid-beta peptide (1-40) across the rat blood-brain barrier. *Neurosci. Res.* 56, 246–252.
- Ito, S., Ueno, T., Ohtsuki, S., and Terasaki, T. (2010). Lack of brain-to-blood efflux transport activity of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) for amyloid-beta peptide(1-40) in mouse: involvement of an LRP-1-independent pathway. *J. Neurochem.* 113, 1356–1363.
- Iturria-Medina, Y., Sotero, R.C., Toussaint, P.J., Mateos-Pérez, J.M., Evans, A.C., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2016). Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat. Commun.* 7, 11934.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., et al. (2000). Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat. Med.* 6, 143–150.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H.J., and Saido, T.C. (2001). Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292, 1550–1552.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13, 45–53.
- Jack, C.R. (2011). Alliance for aging research AD biomarkers work group: structural MRI. *Neurobiol. Aging* 32 Suppl 1, S48–57.
- Jack, C.R. (2016). Brain Atrophy on Magnetic Resonance Imaging as a Biomarker of Neurodegeneration. *JAMA Neurol.* 73, 1179–1182.
- Jakob-Roetne, R., and Jacobsen, H. (2009). Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 48, 3030–3059.
- Janelins, M.C., Mastrangelo, M.A., Oddo, S., LaFerla, F.M., Federoff, H.J., and Bowers, W.J. (2005). Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *J. Neuroinflammation* 2, 23.
- Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Borchelt, D.R. (2004). APP processing and amyloid deposition in mice haplo-insufficient for presenilin 1. *Neurobiol. Aging* 25, 885–892.
- Jankowsky, J.L., Younkin, L.H., Gonzales, V., Fadale, D.J., Slunt, H.H., Lester, H.A., Younkin, S.G., and Borchelt, D.R. (2007). Rodent Aβ Modulates the Solubility and Distribution of Amyloid Deposits in Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* 282, 22707–22720.
- Janzer, R.C., and Raff, M.C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253–257.
- Jaworski, T., Lechat, B., Demedts, D., Gielis, L., Devijver, H., Borghgraef, P., Duimel, H., Verheyen, F., Kügler, S., and Van Leuven, F. (2011). Dendritic degeneration, neurovascular defects, and inflammation precede neuronal loss in a mouse model for tau-mediated neurodegeneration. *Am. J. Pathol.* 179, 2001–2015.
- Jellinger, K.A. (2002). Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 109, 813–836.

- Jessup, W., Gelissen, I.C., Gaus, K., and Kritharides, L. (2006). Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.* 17, 247–257.
- Jeynes, B., and Provias, J. (2008). Evidence for altered LRP/RAGE expression in Alzheimer lesion pathogenesis. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 432–437.
- Johnson, N.A., Jahng, G.-H., Weiner, M.W., Miller, B.L., Chui, H.C., Jagust, W.J., Gorno-Tempini, M.L., and Schuff, N. (2005). Pattern of cerebral hypoperfusion in Alzheimer disease and mild cognitive impairment measured with arterial spin-labeling MR imaging: initial experience. *Radiology* 234, 851–859.
- Johnson-Léger, C., and Imhof, B.A. (2003). Forging the endothelium during inflammation: pushing at a half-open door? *Cell Tissue Res.* 314, 93–105.
- Jucker, M., and Walker, L.C. (2011). Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Ann. Neurol.* 70, 532–540.
- Jucker, M., and Walker, L.C. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501, 45–51.
- Juliano, R.L., and Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152–162.
- Jun, G., Naj, A.C., Beecham, G.W., Wang, L.-S., Bu, R., Buxbaum, J.D., Ertekin-Taner, N., Fallin, M.D., Friedland, R., et al. (2010). Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Arch. Neurol.* 67, 1473–1484.
- Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. (2002). Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int. J. Cancer* 97, 626–630.
- Kageyama, T., Nakamura, M., Matsuo, A., Yamasaki, Y., Takakura, Y., Hashida, M., Kanai, Y., Naito, M., Tsuruo, T., Minato, N., et al. (2000). The 4F2hc/LAT1 complex transports L-DOPA across the blood-brain barrier. *Brain Res.* 879, 115–121.
- Kalaria, R.N. (1992). The blood-brain barrier and cerebral microcirculation in Alzheimer disease. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 4, 226–260.
- Kalaria, R.N. (2000). The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 321–330.
- Kalaria, R.N. (2002). Small vessel disease and Alzheimer's dementia: pathological considerations. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 13 Suppl 2, 48–52.
- Kalaria, R.N., and Harik, S.I. (1989). Reduced glucose transporter at the blood-brain barrier and in cerebral cortex in Alzheimer disease. *J. Neurochem.* 53, 1083–1088.
- Kalaria, R.N., and Pax, A.B. (1995). Increased collagen content of cerebral microvessels in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 705, 349–352.
- Kamiie, J., Ohtsuki, S., Iwase, R., Ohmine, K., Katsukura, Y., Yanai, K., Sekine, Y., Uchida, Y., Ito, S., and Terasaki, T. (2008). Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm. Res.* 25, 1469–1483.
- Kaminski, W.E., Piehler, A., and Wenzel, J.J. (2006). ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 510–524.
- Kamouchi, M., Ago, T., and Kitazono, T. (2011). Brain Pericytes: Emerging Concepts and Functional Roles in Brain Homeostasis. *Cell. Mol. Neurobiol.* 31, 175–193.
- Kanekiyo, T., and Bu, G. (2014). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- β clearance in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 6, 93.

- Karch, C.M., Cruchaga, C., and Goate, A.M. (2014). Alzheimer's disease genetics: from the bench to the clinic. *Neuron* 83, 11–26.
- Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 13, 1211–1233.
- Kaufman, R.J. (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 1389–1398.
- Kay, A.D., May, C., Papadopoulos, N.M., Costello, R., Atack, J.R., Luxenberg, J.S., Cutler, N.R., and Rapoport, S.I. (1987). CSF and serum concentrations of albumin and IgG in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 8, 21–25.
- Keaney, J., and Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* 282, 4067–4079.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553.
- Kim, W.S., Bhatia, S., Elliott, D.A., Agholme, L., Kågedal, K., McCann, H., Halliday, G.M., Barnham, K.J., and Garner, B. (2010). Increased ATP-binding cassette transporter A1 expression in Alzheimer's disease hippocampal neurons. *J. Alzheimers Dis. JAD* 21, 193–205.
- Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 323–355.
- Kimura, T., Ishiguro, K., and Hisanaga, S.-I. (2014). Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 65.
- Kins, S., Kurosinski, P., Nitsch, R.M., and Götz, J. (2003). Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 163, 833–843.
- Kisler, K., Nelson, A.R., Montagne, A., and Zlokovic, B.V. (2017). Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 419–434.
- Kivipelto, M., Helkala, E.L., Laakso, M.P., Hänninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J., and Nissinen, A. (2001). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322, 1447–1451.
- Klaassen, C.D., and Aleksunes, L.M. (2010). Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol. Rev.* 62, 1–96.
- Klag, M.J., Ford, D.E., Mead, L.A., He, J., Whelton, P.K., Liang, K.Y., and Levine, D.M. (1993). Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 328, 313–318.
- Klucken, J., Büchler, C., Orsó, E., Kaminski, W.E., Porsch-Ozcürümez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., et al. (2000). ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 817–822.
- Knouff, C., Hinsdale, M.E., Mezdoor, H., Altenburg, M.K., Watanabe, M., Quarfordt, S.H., Sullivan, P.M., and Maeda, N. (1999). Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *J. Clin. Invest.* 103, 1579–1586.
- Ko, J., Humbert, S., Bronson, R.T., Takahashi, S., Kulkarni, A.B., Li, E., and Tsai, L.H. (2001). p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 6758–6771.
- Kober, A.C., Manavalan, A.P.C., Tam-Amersdorfer, C., Holmér, A., Saeed, A., Fanaee-Danesh, E., Zandl, M., Albrecher, N.M., Björkhem, I., Kostner, G.M., et al. (2017). Implications of cerebrovascular ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) and apolipoprotein M in cholesterol transport at the blood-brain barrier. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 573–588.
- Kodaira, H., Kusuhara, H., Ushiki, J., Fuse, E., and Sugiyama, Y. (2010). Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333, 788–796.

- Koenig, A.M., Mechanic-Hamilton, D., Xie, S.X., Combs, M.F., Cappola, A.R., Xie, L., Detre, J.A., Wolk, D.A., and Arnold, S.E. (2017). Effects of the Insulin Sensitizer Metformin in Alzheimer Disease: Pilot Data From a Randomized Placebo-controlled Crossover Study. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* *31*, 107–113.
- Koepsell, H., and Endou, H. (2004). The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch.* *447*, 666–676.
- Koepsell, H., Lips, K., and Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm. Res.* *24*, 1227–1251.
- Koh, J.Y., Gwag, B.J., Lobner, D., and Choi, D.W. (1995). Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science* *268*, 573–575.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., and Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 5815–5820.
- Koldamova, R., Staufenbiel, M., and Lefterov, I. (2005). Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J. Biol. Chem.* *280*, 43224–43235.
- Koldamova, R., Fitz, N.F., and Lefterov, I. (2010). The role of ATP-binding cassette transporter A1 in Alzheimer's disease and neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* *1801*, 824–830.
- Kook, S.-Y., Hong, H.S., Moon, M., Ha, C.M., Chang, S., and Mook-Jung, I. (2012). A β_{1-42} -RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca²⁺-calcineurin signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 8845–8854.
- Kook, S.-Y., Seok Hong, H., Moon, M., and Mook-Jung, I. (2013). Disruption of blood-brain barrier in Alzheimer disease pathogenesis. *Tissue Barriers* *1*, e23993.
- Koudinov, A.R., and Koudinova, N.V. (2005). Cholesterol homeostasis failure as a unifying cause of synaptic degeneration. *J. Neurol. Sci.* *229–230*, 233–240.
- Koumenis, C., Naczki, C., Koritzinsky, M., Rastani, S., Diehl, A., Sonenberg, N., Koromilas, A., and Wouters, B.G. (2002). Regulation of Protein Synthesis by Hypoxia via Activation of the Endoplasmic Reticulum Kinase PERK and Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2 α . *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7405–7416.
- Kowalska, A., Pruchnik-Wolińska, D., Florczak, J., Modestowicz, R., Szczech, J., Kozubski, W., Rossa, G., and Wender, M. (2004). Genetic study of familial cases of Alzheimer's disease. *Acta Biochim. Pol.* *51*, 245–252.
- Kress, B.T., Iliff, J.J., Xia, M., Wang, M., Wei, H.S., Zeppenfeld, D., Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Liew, J.A., et al. (2014). Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann. Neurol.* *76*, 845–861.
- Kronmal, R.A., Cain, K.C., Ye, Z., and Omenn, G.S. (1993). Total serum cholesterol levels and mortality risk as a function of age. A report based on the Framingham data. *Arch. Intern. Med.* *153*, 1065–1073.
- Ksiazek-Reding, H., Morgan, K., Mattiace, L.A., Davies, P., Liu, W.K., Yen, S.H., Weidenheim, K., and Dickson, D.W. (1994). Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration. *Am. J. Pathol.* *145*, 1496–1508.
- Kudo, T., Imaizumi, K., Tanimukai, H., Katayama, T., Sato, N., Nakamura, Y., Tanaka, T., Kashiwagi, Y., Jinno, Y., Tohyama, M., et al. (2000). Are cerebrovascular factors involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging* *21*, 215–224.
- Kuhnke, D., Jedlitschky, G., Grube, M., Krohn, M., Jucker, M., Mosyagin, I., Cascorbi, I., Walker, L.C., Kroemer, H.K., Warzok, R.W., et al. (2007). MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1) Mediates Transport of Alzheimer's amyloid-beta peptides--implications for the mechanisms of Abeta clearance at the blood-brain barrier. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *17*, 347–353.
- Kullak-Ublick, G.A., Hagenbuch, B., Stieger, B., Schteingart, C.D., Hofmann, A.F., Wolkoff, A.W., and Meier, P.J. (1995). Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* *109*, 1274–1282.

- Kullak-Ublick, G.A., Fisch, T., Oswald, M., Hagenbuch, B., Meier, P.J., Beuers, U., and Paumgartner, G. (1998). Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS): identification of a carrier protein in human liver and brain. *FEBS Lett.* **424**, 173–176.
- Kumagai, A.K. (1999). Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **15**, 261–273.
- Kumar, A., Singh, A., and Ekavali, null (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol. Rep. PR* **67**, 195–203.
- Kuo, W.L., Montag, A.G., and Rosner, M.R. (1993). Insulin-degrading enzyme is differentially expressed and developmentally regulated in various rat tissues. *Endocrinology* **132**, 604–611.
- Kurata, T., Miyazaki, K., Kozuki, M., Panin, V.-L., Morimoto, N., Ohta, Y., Nagai, M., Ikeda, Y., Matsuura, T., and Abe, K. (2011). Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged APP mice. *Brain Res.* **1371**, 161–170.
- Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2007). ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **453**, 735–744.
- La Schiazza, R., Lamari, F., Foglietti, M.-J., Hainque, B., Bernard, M., and Beaudoux, J.-L. (2008). [Cellular energetic metabolism of cerebral tissue: metabolic characteristics of glial tumours]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **66**, 131–141.
- Labbadia, J., and Morimoto, R.I. (2015). The Biology of Proteostasis in Aging and Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 435–464.
- Ladeby, R., Wrenfeldt, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dalmau, I., and Finsen, B. (2005). Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **48**, 196–206.
- Laird, F.M., Cai, H., Savonenko, A.V., Farah, M.H., He, K., Melnikova, T., Wen, H., Chiang, H.-C., Xu, G., Koliatsos, V.E., et al. (2005). BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 11693–11709.
- Lam, F.C., Liu, R., Lu, P., Shapiro, A.B., Renoir, J.M., Sharom, F.J., and Reiner, P.B. (2001). beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J. Neurochem.* **76**, 1121–1128.
- Lambert, J.-C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **41**, 1094–1099.
- Lambert, J.C., Ibrahim-Verbaas, C.A., Harold, D., Naj, A.C., Sims, R., Bellenguez, C., DeStafano, A.L., Bis, J.C., Beecham, G.W., Grenier-Boley, B., et al. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **45**, 1452–1458.
- Landau, S.M., Harvey, D., Madison, C.M., Koeppe, R.A., Reiman, E.M., Foster, N.L., Weiner, M.W., Jagust, W.J., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2011). Associations between cognitive, functional, and FDG-PET measures of decline in AD and MCI. *Neurobiol. Aging* **32**, 1207–1218.
- Lautenschlager, N.T., Cupples, L.A., Rao, V.S., Auerbach, S.A., Becker, R., Burke, J., Chui, H., Duara, R., Foley, E.J., Glatt, S.L., et al. (1996). Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology* **46**, 641–650.
- Leduc, V., Jasmin-Bélanger, S., and Poirier, J. (2010). APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* **16**, 469–477.
- Lee, H.-G., Perry, G., Moreira, P.I., Garrett, M.R., Liu, Q., Zhu, X., Takeda, A., Nunomura, A., and Smith, M.A. (2005). Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol. Med.* **11**, 164–169.

- Lee, K.Y., Clark, A.W., Rosales, J.L., Chapman, K., Fung, T., and Johnston, R.N. (1999). Elevated neuronal Cdc2-like kinase activity in the Alzheimer disease brain. *Neurosci. Res.* **34**, 21–29.
- Lee, M.K., Borchelt, D.R., Kim, G., Thinakaran, G., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Martin, L.J., Kittur, A., Gandy, S., Levey, A.I., et al. (1997). Hyperaccumulation of FAD-linked presenilin 1 variants in vivo. *Nat. Med.* **3**, 756–760.
- Lemere, C.A., and Masliah, E. (2010). Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy? *Nat. Rev. Neurol.* **6**, 108–119.
- Leoni, V., and Caccia, C. (2013). 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. *Biochimie* **95**, 595–612.
- Leoni, V., Masterman, T., Patel, P., Meaney, S., Diczfalusy, U., and Björkhem, I. (2003). Side chain oxidized oxysterols in cerebrospinal fluid and the integrity of blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J. Lipid Res.* **44**, 793–799.
- Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352–357.
- Leung, L., Andrews-Zwilling, Y., Yoon, S.Y., Jain, S., Ring, K., Dai, J., Wang, M.M., Tong, L., Walker, D., and Huang, Y. (2012). Apolipoprotein E4 causes age- and sex-dependent impairments of hilar GABAergic interneurons and learning and memory deficits in mice. *PLoS One* **7**, e53569.
- Leuthold, S., Hagenbuch, B., Mohebbi, N., Wagner, C.A., Meier, P.J., and Stieger, B. (2009). Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**, C570–582.
- Levine, B., and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* **115**, 2679–2688.
- Lew, J., Huang, Q.Q., Qi, Z., Winkfein, R.J., Aebbersold, R., Hunt, T., and Wang, J.H. (1994). A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371**, 423–426.
- Lewandowsky, M. (1900). Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. *Z Clin Med* **40**, 40:480–494.
- Li, M., Ona, V.O., Guégan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L.J., Olszewski, A.J., Stieg, P.E., Lee, J.P., Przedborski, S., et al. (2000). Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* **288**, 335–339.
- Li, R., Lindholm, K., Yang, L.-B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., et al. (2004). Amyloid β peptide load is correlated with increased β -secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3632–3637.
- Li, Y., Rinne, J.O., Mosconi, L., Pirraglia, E., Rusinek, H., DeSanti, S., Kemppainen, N., Någren, K., Kim, B.-C., Tsui, W., et al. (2008). Regional analysis of FDG and PIB-PET images in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **35**, 2169–2181.
- Lim, G.P., Yang, F., Chu, T., Chen, P., Beech, W., Teter, B., Tran, T., Ubeda, O., Ashe, K.H., Frautschy, S.A., et al. (2000). Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, 5709–5714.
- Lin, M.T., and Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787–795.
- Lin, L., Yee, S.W., Kim, R.B., and Giacomini, K.M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 543–560.
- Linton, K.J. (2007). Structure and function of ABC transporters. *Physiol. Bethesda Md* **22**, 122–130.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings¹. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3–26.

- Liraz, O., Boehm-Cagan, A., and Michaelson, D.M. (2013). ApoE4 induces A β 42, tau, and neuronal pathology in the hippocampus of young targeted replacement apoE4 mice. *Mol. Neurodegener.* 8, 16.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1942–1950.
- Löscher, W., and Potschka, H. (2005). Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 2, 86–98.
- Lovell, M.A., Xiong, S., Xie, C., Davies, P., and Markesbery, W.R. (2004). Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3. *J. Alzheimers Dis. JAD* 6, 659–671; discussion 673–681.
- Loy, C.T., Schofield, P.R., Turner, A.M., and Kwok, J.B.J. (2014). Genetics of dementia. *Lancet Lond. Engl.* 383, 828–840.
- Luissint, A.-C., Artus, C., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., and Couraud, P.-O. (2012a). Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 9, 23.
- Luissint, A.-C., Federici, C., Guillonneau, F., Chrétien, F., Camoin, L., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., and Couraud, P.-O. (2012b). Guanine nucleotide-binding protein G α i2: a new partner of claudin-5 that regulates tight junction integrity in human brain endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 860–873.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., et al. (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.* 4, 231–232.
- Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., Chaney, M., et al. (2004). A β AD directly links A β to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304, 448–452.
- Lütjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Sidén, A., Diczfalussy, U., and Björkhem, I. (1996). Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9799–9804.
- Luurtsema, G., Molthoff, C.F.M., Schuit, R.C., Windhorst, A.D., Lammertsma, A.A., and Franssen, E.J.F. (2005). Evaluation of (R)-[11C]verapamil as PET tracer of P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: kinetics and metabolism in the rat. *Nucl. Med. Biol.* 32, 87–93.
- Ly, J.V., Rowe, C.C., Villemagne, V.L., Zavala, J.A., Ma, H., O'Keefe, G., Gong, S.J., Gunawan, R., Churilov, L., Saunderson, T., et al. (2010). Cerebral β -amyloid detected by Pittsburgh compound B positron emission topography predisposes to recombinant tissue plasminogen activator-related hemorrhage. *Ann. Neurol.* 68, 959–962.
- Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2001). The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* 107, 827–830.
- Ma, J., Yee, A., Brewer, H.B., Das, S., and Potter, H. (1994). Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* 372, 92–94.
- Macé, S., Cousin, E., Ricard, S., Génin, E., Spanakis, E., Lafargue-Soubigou, C., Génin, B., Fournel, R., Roche, S., Haussy, G., et al. (2005). ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 18, 119–125.
- Mack, J.T., Townsend, D.M., Beljanski, V., and Tew, K.D. (2007). The ABCA2 transporter: intracellular roles in trafficking and metabolism of LDL-derived cholesterol and sterol-related compounds. *Curr. Drug Metab.* 8, 47–57.
- Mahley, R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622–630.
- Mahley, R.W., and Huang, Y. (2006). Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 185, 8–14.

- Mahringer, A., and Fricker, G. (2016). ABC transporters at the blood-brain barrier. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 12, 499–508.
- Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C., Schinkel, A.H., van De Vijver, M.J., Scheper, R.J., and Schellens, J.H. (2001). Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 61, 3458–3464.
- Mancardi, G.L., Perdelli, F., Rivano, C., Leonardi, A., and Bugiani, O. (1980). Thickening of the basement membrane of cortical capillaries in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 49, 79–83.
- Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., and Reddy, P.H. (2006). Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1437–1449.
- Mao, Q. (2005). Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J.* 7, E118–E133.
- Marwarha, G., Dasari, B., Prasanthi, J.R.P., Schommer, J., and Ghribi, O. (2010). Leptin reduces the accumulation of Abeta and phosphorylated tau induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit organotypic slices. *J. Alzheimers Dis. JAD* 19, 1007–1019.
- Masson, C., Leys, D., and Buée, L. (2000). [Cerebral amyloid angiopathies]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983 29, 1717–1722.
- Mathiisen, T.M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., and Ottersen, O.P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 58, 1094–1103.
- Matsubara, E., Ghiso, J., Frangione, B., Amari, M., Tomidokoro, Y., Ikeda, Y., Harigaya, Y., Okamoto, K., and Shoji, M. (1999). Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Ann. Neurol.* 45, 537–541.
- Matthews, R.T., Yang, L., Browne, S., Baik, M., and Beal, M.F. (1998). Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8892–8897.
- Mattson, M.P. (2003). Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med.* 3, 65–94.
- Mattson, M.P., Cheng, B., Culwell, A.R., Esch, F.S., Lieberburg, I., and Rydel, R.E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10, 243–254.
- Maurer, K., Volk, S., and Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet Lond. Engl.* 349, 1546–1549.
- Mawuenyega, K.G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J.C., Yarasheski, K.E., and Bateman, R.J. (2010). Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330, 1774.
- McAllister, M.S., Krizanac-Bengez, L., Macchia, F., Naftalin, R.J., Pedley, K.C., Mayberg, M.R., Marroni, M., Leaman, S., Stanness, K.A., and Janigro, D. (2001). Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain Res.* 904, 20–30.
- McConlogue, L., Buttini, M., Anderson, J.P., Brigham, E.F., Chen, K.S., Freedman, S.B., Games, D., Johnson-Wood, K., Lee, M., Zeller, M., et al. (2007). Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* 282, 26326–26334.
- McDevitt, C.A., Collins, R.F., Conway, M., Modok, S., Storm, J., Kerr, I.D., Ford, R.C., and Callaghan, R. (2006). Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Struct. Lond. Engl.* 1993 14, 1623–1632.
- McGarry, A., McDermott, M., Kieburz, K., de Blicke, E.A., Beal, F., Marder, K., Ross, C., Shoulson, I., Gilbert, P., Mallonee, W.M., et al. (2017). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in Huntington disease. *Neurology* 88, 152–159.

- McGowan, E., Sanders, S., Iwatsubo, T., Takeuchi, A., Saido, T., Zehr, C., Yu, X., Uljon, S., Wang, R., Mann, D., et al. (1999). Amyloid phenotype characterization of transgenic mice overexpressing both mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin 1 transgenes. *Neurobiol. Dis.* 6, 231–244.
- McNaught, K.S.P., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., and Olanow, C.W. (2003). Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 179, 38–46.
- McNaught, K.S.P., Perl, D.P., Brownell, A.-L., and Olanow, C.W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 56, 149–162.
- Mecocci, P., Parnetti, L., Reboldi, G.P., Santucci, C., Gaiti, A., Ferri, C., Gernini, I., Romagnoli, M., Cadini, D., and Senin, U. (1991). Blood-brain-barrier in a geriatric population: barrier function in degenerative and vascular dementias. *Acta Neurol. Scand.* 84, 210–213.
- Medawar, P.B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.* 29, 58–69.
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., and Sharma, P.L. (2013). Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 698, 6–18.
- Meraz-Ríos, M.A., Lira-De León, K.I., Campos-Peña, V., De Anda-Hernández, M.A., and Mena-López, R. (2010). Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 112, 1353–1367.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., and Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36, 587–597.
- Mielke, M.M., Zandi, P.P., Sjögren, M., Gustafson, D., Ostling, S., Steen, B., and Skoog, I. (2005). High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology* 64, 1689–1695.
- Mikitsch, J.L., and Chacko, A.-M. (2014). Pathways for small molecule delivery to the central nervous system across the blood-brain barrier. *Perspect. Med. Chem.* 6, 11–24.
- Miller, R.M., and Federoff, H.J. (2008). Isoform-specific effects of ApoE on HSV immediate early gene expression and establishment of latency. *Neurobiol. Aging* 29, 71–77.
- Miller, M.C., Tavares, R., Johanson, C.E., Hovanesian, V., Donahue, J.E., Gonzalez, L., Silverberg, G.D., and Stopa, E.G. (2008). Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1230, 273–280.
- Miners, J.S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L.E., Kehoe, P.G., and Love, S. (2008). Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 18, 240–252.
- Minogue, A.M., Jones, R.S., Kelly, R.J., McDonald, C.L., Connor, T.J., and Lynch, M.A. (2014). Age-associated dysregulation of microglial activation is coupled with enhanced blood-brain barrier permeability and pathology in APP/PS1 mice. *Neurobiol. Aging* 35, 1442–1452.
- Miyakawa, T., Uehara, Y., Desaki, J., Kimura, T., and Kuramoto, R. (1988). Morphological changes of microvessels in the brain with Alzheimer's disease. *Jpn. J. Psychiatry Neurol.* 42, 819–824.
- Mizuno, T., Nakata, M., Naiki, H., Michikawa, M., Wang, R., Haass, C., and Yanagisawa, K. (1999). Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid beta-protein in cell culture. *J. Biol. Chem.* 274, 15110–15114.
- Mogi, M., Li, J.-M., Tsukuda, K., Iwanami, J., Min, L.-J., Sakata, A., Fujita, T., Iwai, M., and Horiuchi, M. (2008). Telmisartan prevented cognitive decline partly due to PPAR-gamma activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 446–449.
- Molinski, S.V., Bozóky, Z., Iram, S.H., and Ahmadi, S. (2017). Biophysical Approaches Facilitate Computational Drug Discovery for ATP-Binding Cassette Proteins. *Int. J. Med. Chem.* 2017, 1529402.
- Montagne, A., Barnes, S.R., Sweeney, M.D., Halliday, M.R., Sagare, A.P., Zhao, Z., Toga, A.W., Jacobs, R.E., Liu, C.Y., Amezcua, L., et al. (2015). Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* 85, 296–302.

- Montagne, A., Nation, D.A., Pa, J., Sweeney, M.D., Toga, A.W., and Zlokovic, B.V. (2016). Brain imaging of neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 687.
- Moody, D.M., Santamore, W.P., and Bell, M.A. (1991). Does tortuosity in cerebral arterioles impair down-autoregulation in hypertensives and elderly normotensives? A hypothesis and computer model. *Clin. Neurosurg.* 37, 372–387.
- Mooradian, A.D., Chung, H.C., and Shah, G.N. (1997). GLUT-1 Expression in the Cerebra of Patients with Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Aging* 18, 469–474.
- Morelli, L., Llovera, R.E., Mathov, I., Lue, L.-F., Frangione, B., Ghiso, J., and Castaño, E.M. (2004). Insulin-degrading enzyme in brain microvessels: proteolysis of amyloid {beta} vasculotropic variants and reduced activity in cerebral amyloid angiopathy. *J. Biol. Chem.* 279, 56004–56013.
- Morgan, C., Colombres, M., Nuñez, M.T., and Inestrosa, N.C. (2004). Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 74, 323–349.
- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., et al. (2000). A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 982–985.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., and Yasuhiko, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J. Biol. Chem.* 277, 34287–34294.
- Morris, A.W.J., Carare, R.O., Schreiber, S., and Hawkes, C.A. (2014). The Cerebrovascular Basement Membrane: Role in the Clearance of β -amyloid and Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front. Aging Neurosci.* 6, 251.
- Morris, J.C., Storandt, M., McKeel, D.W., Rubin, E.H., Price, J.L., Grant, E.A., and Berg, L. (1996). Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology* 46, 707–719.
- Morris, J.C., Aisen, P.S., Bateman, R.J., Benzinger, T.L.S., Cairns, N.J., Fagan, A.M., Ghetti, B., Goate, A.M., Holtzman, D.M., Klunk, W.E., et al. (2012). Developing an international network for Alzheimer research: The Dominantly Inherited Alzheimer Network. *Clin. Investig.* 2, 975–984.
- Mosconi, L. (2005). Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 32, 486–510.
- Mosconi, L., Pupi, A., and De Leon, M.J. (2008). Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 180–195.
- Mountjoy, C.Q., Roth, M., Evans, N.J., and Evans, H.M. (1983). Cortical neuronal counts in normal elderly controls and demented patients. *Neurobiol. Aging* 4, 1–11.
- Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520–562.
- Mouton-Liger, F., Paquet, C., Dumurgier, J., Lapalus, P., Gray, F., Laplanche, J.-L., Hugon, J., and Groupe d'Investigation du Liquide Céphalorachidien Study Network (2012a). Increased cerebrospinal fluid levels of double-stranded RNA-dependant protein kinase in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 71, 829–835.
- Mouton-Liger, F., Paquet, C., Dumurgier, J., Bouras, C., Pradier, L., Gray, F., and Hugon, J. (2012b). Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 α pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 885–896.
- Mouton-Liger, F., Rebillat, A.-S., Gourmaud, S., Paquet, C., Leguen, A., Dumurgier, J., Bernadelli, P., Taupin, V., Pradier, L., Rooney, T., et al. (2015). PKR downregulation prevents neurodegeneration and β -amyloid production in a thiamine-deficient model. *Cell Death Dis.* 6, e1594.

- Mruk, D.D., Su, L., and Cheng, C.Y. (2011). Emerging role for drug transporters at the blood-testis barrier. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 99–106.
- Mueckler, M., and Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 121–138.
- Muir, J.L., Page, K.J., Sirinathsinghji, D.J., Robbins, T.W., and Everitt, B.J. (1993). Excitotoxic lesions of basal forebrain cholinergic neurons: effects on learning, memory and attention. *Behav. Brain Res.* 57, 123–131.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat. Genet.* 1, 345–347.
- Muller, W.A. (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24, 327–334.
- Müller, K., Courtois, G., Ursini, M.V., and Schwaninger, M. (2017). New Insight Into the Pathogenesis of Cerebral Small-Vessel Diseases. *Stroke* 48, 520–527.
- Murakami, H., Takanaga, H., Matsuo, H., Ohtani, H., and Sawada, Y. (2000). Comparison of blood-brain barrier permeability in mice and rats using in situ brain perfusion technique. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 279, H1022–H1028.
- Murayama, S., Mori, H., Ihara, Y., and Tomonaga, M. (1990). Immunocytochemical and ultrastructural studies of Pick's disease. *Ann. Neurol.* 27, 394–405.
- Murphy, M.P., and LeVine, H. (2010). Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. *J. Alzheimers Dis. JAD* 19, 311.
- Nag, S., Yee, B.K., and Tang, F. (1999). Reduction in somatostatin and substance P levels and choline acetyltransferase activity in the cortex and hippocampus of the rat after chronic intracerebroventricular infusion of β -amyloid (1-40). *Brain Res. Bull.* 50, 251–262.
- Nagao, K., Tomioka, M., and Ueda, K. (2011). Function and regulation of ABCA1--membrane meso-domain organization and reorganization. *FEBS J.* 278, 3190–3203.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449–1456.
- Nagle, M.A., Wu, W., Eraly, S.A., and Nigam, S.K. (2013). Organic anion transport pathways in antiviral handling in choroid plexus in Oat1 (Slc22a6) and Oat3 (Slc22a8) deficient tissue. *Neurosci. Lett.* 534, 133–138.
- Naj, A.C., Jun, G., Beecham, G.W., Wang, L.-S., Vardarajan, B.N., Buross, J., Gallins, P.J., Buxbaum, J.D., Jarvik, G.P., Crane, P.K., et al. (2011). Common variants in MS4A4/MS4A6E, CD2uAP, CD33, and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 43, 436–441.
- Nakamura, S., Murayama, N., Noshita, T., Annoura, H., and Ohno, T. (2001). Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide. *Brain Res.* 912, 128–136.
- Nazer, B., Hong, S., and Selkoe, D.J. (2008). LRP promotes endocytosis and degradation, but not transcytosis, of the amyloid- β peptide in a blood-brain barrier in vitro model. *Neurobiol. Dis.* 30, 94.
- Nelson, A.R., Sweeney, M.D., Sagare, A.P., and Zlokovic, B.V. (2016). Neurovascular Dysfunction and Neurodegeneration in Dementia and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 887.
- Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N.J., Castellani, R.J., Crain, B.J., Davies, P., Del Tredici, K., et al. (2012). Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 362–381.
- Neuwelt, E., Abbott, N.J., Abrey, L., Banks, W.A., Blakley, B., Davis, T., Engelhardt, B., Grammas, P., Nedergaard, M., Nutt, J., et al. (2008). Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol.* 7, 84–96.

- Nguyen, M.D., Julien, J.-P., and Rivest, S. (2002). Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 216–227.
- Ni, Z., Bikadi, Z., Rosenberg, M.F., and Mao, Q. (2010). Structure and Function of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *Curr. Drug Metab.* *11*, 603–617.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* *161*, 653–660.
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., et al. (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* *38*, 555–565.
- Notkola, I.L., Sulkava, R., Pekkanen, J., Erkinjuntti, T., Ehnholm, C., Kivinen, P., Tuomilehto, J., and Nissinen, A. (1998). Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* *17*, 14–20.
- Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., et al. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 10129–10140.
- Obradovic, T., Dobson, G.G., Shingaki, T., Kungu, T., and Hidalgo, I.J. (2007). Assessment of the First and Second Generation Antihistamines Brain Penetration and Role of P-Glycoprotein. *Pharm. Res.* *24*, 318–327.
- O'Brien, J.T., and Markus, H.S. (2014). Vascular risk factors and Alzheimer's disease. *BMC Med.* *12*, 218.
- O'Brien, R.J., and Wong, P.C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* *34*, 185–204.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003a). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* *39*, 409–421.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., and LaFerla, F.M. (2003b). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *24*, 1063–1070.
- Oddo, S., Caccamo, A., Cheng, D., Juleh, B., Torp, R., and LaFerla, F.M. (2007). Genetically augmenting tau levels does not modulate the onset or progression of A β pathology in transgenic mice. *J. Neurochem.* *102*, 1053–1063.
- Oh, S., Tseng, G.C., and Sibille, E. (2011). Reciprocal phylogenetic conservation of molecular aging in mouse and human brain. *Neurobiol. Aging* *32*, 1331–1335.
- Ohno, K., Pettigrew, K.D., and Rapoport, S.I. (1978). Lower limits of cerebrovascular permeability to nonelectrolytes in the conscious rat. *Am. J. Physiol.* *235*, H299–307.
- Ohno, M., Sametsky, E.A., Younkin, L.H., Oakley, H., Younkin, S.G., Citron, M., Vassar, R., and Disterhoft, J.F. (2004). BACE1 Deficiency Rescues Memory Deficits and Cholinergic Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuron* *41*, 27–33.
- Ohtsuki, S., and Terasaki, T. (2007). 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.* *24*, 1745–1758.
- Ohtsuki, S., Watanabe, Y., Hori, S., Suzuki, H., Bhongsatiern, J., Fujiyoshi, M., Kamoi, M., Kamiya, N., Takanaga, H., and Terasaki, T. (2004). mRNA expression of the ATP-binding cassette transporter subfamily A (ABCA) in rat and human brain capillary endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* *27*, 1437–1440.
- Ohtsuki, S., Ito, S., Matsuda, A., Hori, S., Abe, T., and Terasaki, T. (2007). Brain-to-blood elimination of 24S-hydroxycholesterol from rat brain is mediated by organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) at the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* *103*, 1430–1438.

- Olariu, A., Yamada, K., Mamiya, T., Hefco, V., and Nabeshima, T. (2002). Memory impairment induced by chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid (1–40) involves downregulation of protein kinase C. *Brain Res.* 957, 278–286.
- Oldendorf, W.H., Cornford, M.E., and Brown, W.J. (1977). 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.* 1, 409–417.
- Oldfield, S., Lowry, C., Ruddick, J., and Lightman, S. (2002). ABCG4: a novel human white family ABC-transporter expressed in the brain and eye. *Biochim. Biophys. Acta* 1591, 175–179.
- Ona, V.O., Li, M., Vonsattel, J.P., Andrews, L.J., Khan, S.Q., Chung, W.M., Frey, A.S., Menon, A.S., Li, X.J., Stieg, P.E., et al. (1999). Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 399, 263–267.
- Ott, A., Breteler, M.M., de Bruyne, M.C., van Harskamp, F., Grobbee, D.E., and Hofman, A. (1997). Atrial fibrillation and dementia in a population-based study. The Rotterdam Study. *Stroke* 28, 316–321.
- Oyama, F., Sawamura, N., Kobayashi, K., Morishima-Kawashima, M., Kuramochi, T., Ito, M., Tomita, T., Maruyama, K., Saido, T.C., Iwatsubo, T., et al. (1998). Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid beta-protein 42 in the brain. *J. Neurochem.* 71, 313–322.
- Pallas, M., Camins, A., Smith, M.A., Perry, G., Lee, H., and Casadesus, G. (2008). From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J. Alzheimers Dis. JAD* 15, 615–624.
- Panchal, M., Loeper, J., Cossec, J.-C., Perruchini, C., Lazar, A., Pompon, D., and Duyckaerts, C. (2010). Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 51, 598–605.
- Paquet, C., Dumurgier, J., and Hugon, J. (2015). Pro-Apoptotic Kinase Levels in Cerebrospinal Fluid as Potential Future Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Front. Neurol.* 6, 168.
- Pardridge, W.M., Triguero, D., Buciak, J., and Yang, J. (1990). Evaluation of cationized rat albumin as a potential blood-brain barrier drug transport vector. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 893–899.
- Park, R., Kook, S.-Y., Park, J.-C., and Mook-Jung, I. (2014). A β 1-42 reduces P-glycoprotein in the blood-brain barrier through RAGE-NF- κ B signaling. *Cell Death Dis.* 5, e1299.
- Patching, S.G. (2017). Glucose Transporters at the Blood-Brain Barrier: Function, Regulation and Gateways for Drug Delivery. *Mol. Neurobiol.* 54, 1046–1077.
- Patel, C.V., Handy, I., Goldsmith, T., and Patel, R.C. (2000). PACT, a Stress-modulated Cellular Activator of Interferon-induced Double-stranded RNA-activated Protein Kinase, PKR. *J. Biol. Chem.* 275, 37993–37998.
- Patrick, G.N., and Zukerberg, L. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615.
- Paul, J., Strickland, S., and Melchor, J.P. (2007). Fibrin deposition accelerates neurovascular damage and neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 204, 1999–2008.
- Peel, A.L., and Bredesen, D.E. (2003). Activation of the cell stress kinase PKR in Alzheimer's disease and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 14, 52–62.
- Pendlebury, S.T., Wadling, S., Silver, L.E., Mehta, Z., and Rothwell, P.M. (2011). Transient cognitive impairment in TIA and minor stroke. *Stroke* 42, 3116–3121.
- Perani, D., Daniela, P., Schillaci, O., Orazio, S., Padovani, A., Alessandro, P., Nobili, F.M., Mariano, N.F., Iaccarino, L., Leonardo, I., et al. (2014). A survey of FDG- and amyloid-PET imaging in dementia and GRADE analysis. *BioMed Res. Int.* 2014, 785039.

- Pérez, A., Morelli, L., Cresto, J.C., and Castaño, E.M. (2000). Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochem. Res.* 25, 247–255.
- Perl, D.P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 77, 32–42.
- Perlmuter, L.S. (1994). Microvascular pathology and vascular basement membrane components in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 9, 33–40.
- Persidsky, Y., Ramirez, S.H., Haorah, J., and Kanmogne, G.D. (2006). Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* 1, 223–236.
- Pfriege, F.W. (2003). Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 1158–1171.
- Pfriege, F.W., and Barres, B.A. (1996). New views on synapse-glia interactions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 615–621.
- Picone, P., Nuzzo, D., Caruana, L., Scafidi, V., and Di Carlo, M. (2014). Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 780179.
- Piehler, A.P., Özcürümez, M., and Kaminski, W.E. (2012). A-Subclass ATP-Binding Cassette Proteins in Brain Lipid Homeostasis and Neurodegeneration. *Front. Psychiatry* 3.
- Pillot, T., Drouet, B., Queillé, S., Labeur, C., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., Pinçon-Raymond, M., and Chambaz, J. (1999). The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J. Neurochem.* 73, 1626–1634.
- Pirttilä, T., Järvenpää, R., Dastidar, P., and Frey, H. (1993). Brain atrophy in neurodegenerative diseases. Quantitative and qualitative CT analysis. *Acta Radiol. Stockh. Swed.* 1987 34, 296–302.
- Plummer, S., Van den Heuvel, C., Thornton, E., Corrigan, F., and Cappai, R. (2016). The Neuroprotective Properties of the Amyloid Precursor Protein Following Traumatic Brain Injury. *Aging Dis.* 7, 163–179.
- Poduslo, J.F., Curran, G.L., Wengenack, T.M., Malester, B., and Duff, K. (2001). Permeability of proteins at the blood-brain barrier in the normal adult mouse and double transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 8, 555–567.
- Poirier, J. (2005). Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 26, 355–361.
- Polidori, M.C., Mariani, E., Mecocci, P., and Nelles, G. (2006). Congestive heart failure and Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* 28, 588–594.
- Polli, J.W., Olson, K.L., Chism, J.P., John-Williams, L.S., Yeager, R.L., Woodard, S.M., Otto, V., Castellino, S., and Demby, V.E. (2009). An unexpected synergist role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the central nervous system penetration of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib (N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-({[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino}methyl)-2-furyl]-4-quinazolinamine; GW572016). *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37, 439–442.
- Ponomarev, E.D., Shriver, L.P., Maresz, K., and Dittel, B.N. (2005). Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J. Neurosci. Res.* 81, 374–389.
- Ponomarev, E.D., Shriver, L.P., and Dittel, B.N. (2006). CD40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176, 1402–1410.
- Prabhu, Y., Burgos, P.V., Schindler, C., Farías, G.G., Magadár, J.G., and Bonifacino, J.S. (2012). Adaptor protein 2-mediated endocytosis of the β -secretase BACE1 is dispensable for amyloid precursor protein processing. *Mol. Biol. Cell* 23, 2339–2351.

- Prasanthi, J.R., Huls, A., Thomasson, S., Thompson, A., Schommer, E., and Ghribi, O. (2009). Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Neurodegener.* 4, 1.
- Prelli, F., Castaño, E., Glenner, G.G., and Frangione, B. (1988). Differences between vascular and plaque core amyloid in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 51, 648–651.
- Price, D.L., Martin, L.J., Sisodia, S.S., Wagster, M.V., Koo, E.H., Walker, L.C., Koliatsos, V.E., and Cork, L.C. (1991). Aged non-human primates: an animal model of age-associated neurodegenerative disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 1, 287–296.
- Pritchard, S.M., Dolan, P.J., Vitkus, A., and Johnson, G.V.W. (2011). The toxicity of tau in Alzheimer disease: turnover, targets and potential therapeutics. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1621–1635.
- Prusiner, S.B. (2012). Cell biology. A unifying role for prions in neurodegenerative diseases. *Science* 336, 1511–1513.
- Puchowicz, M.A., Xu, K., Magness, D., Miller, C., Lust, W.D., Kern, T.S., and LaManna, J.C. (2004). Comparison of glucose influx and blood flow in retina and brain of diabetic rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 449–457.
- Pupillo, E., Poloni, M., Bianchi, E., Giussani, G., Logroscino, G., Zoccolella, S., Chiò, A., Calvo, A., Corbo, M., Lunetta, C., et al. (2017). Trauma and amyotrophic lateral sclerosis: a european population-based case-control study from the EURALS consortium. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 1–8.
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fà, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., and Arancio, O. (2008). Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 14537–14545.
- Qiu, C., Winblad, B., Marengoni, A., Klarin, I., Fastbom, J., and Fratiglioni, L. (2006). Heart failure and risk of dementia and Alzheimer disease: a population-based cohort study. *Arch. Intern. Med.* 166, 1003–1008.
- Qosa, H., Miller, D.S., Pasinelli, P., and Trotti, D. (2015). Regulation of ABC Efflux Transporters at Blood-Brain Barrier in Health and Neurological Disorders. *Brain Res.* 1628, 298–316.
- Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344.
- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S.A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M.E., Jäggli, F., Wolburg, H., Gengler, S., et al. (2006). Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 7, 940–946.
- Raivich, G., Jones, L.L., Kloss, C.U., Werner, A., Neumann, H., and Kreutzberg, G.W. (1998). Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 5804–5816.
- Ramirez-Bermudez, J. (2012). Alzheimer's disease: critical notes on the history of a medical concept. *Arch. Med. Res.* 43, 595–599.
- Ransohoff, R.M., and Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 119–145.
- Rao, R.V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P.C., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett.* 514, 122–128.
- Rao, V.V., Dahlheimer, J.L., Bardgett, M.E., Snyder, A.Z., Finch, R.A., Sartorelli, A.C., and Piwnica-Worms, D. (1999). Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3900–3905.
- Ravikumar, B., Duden, R., and Rubinsztein, D.C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1107–1117.

- Rebeck, G.W., Reiter, J.S., Strickland, D.K., and Hyman, B.T. (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11, 575–580.
- Redzic, Z. (2011). Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids Barriers CNS* 8, 3.
- Reese, T.S., and Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34, 207–217.
- Reeves, R.H., Irving, N.G., Moran, T.H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S.S., Schmidt, C., Bronson, R.T., and Davisson, M.T. (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat. Genet.* 11, 177–184.
- Refolo, L.M., Pappolla, M.A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S.D., Thomas-Bryant, T., Tint, G.S., Wang, R., Mercken, M., Petanceska, S.S., et al. (2001). A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 8, 890–899.
- Reitz, C. (2012). Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012, 369808.
- Reitz, C., Brayne, C., and Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 137–152.
- Remondelli, P., and Renna, M. (2017). The Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Disorders and Its Potential Therapeutic Significance. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 187.
- Rennels, M.L., Gregory, T.F., and Fujimoto, K. (1983). Innervation of capillaries by local neurons in the cat hypothalamus: a light microscopic study with horseradish peroxidase. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 3, 535–542.
- Rezai-Zadeh, K., Gate, D., and Town, T. (2009). CNS Infiltration of Peripheral Immune Cells: D-Day for Neurodegenerative Disease? *J. Neuroimmune Pharmacol.* 4, 462–475.
- Richard, E., van Gool, W.A., Hoozemans, J.J.M., van Haastert, E.S., Eikelenboom, P., Rozemuller, A.J.M., and van de Berg, W.D.J. (2010). Morphometric changes in the cortical microvascular network in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 22, 811–818.
- Ritchie, K., Carrière, I., de Mendonca, A., Portet, F., Dartigues, J.F., Rouaud, O., Barberger-Gateau, P., and Ancelin, M.L. (2007). The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology* 69, 536–545.
- Robey, R.W., To, K.K.K., Polgar, O., Dohse, M., Fetsch, P., Dean, M., and Bates, S.E. (2009). ABCG2: a perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 3–13.
- Robinson, S.R., Bishop, G.M., Lee, H.-G., and Münch, G. (2004). Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget. *Neurobiol. Aging* 25, 609–615.
- Rochette, M.J., and Murphy, M.P. (2002). Gamma-secretase: substrates and inhibitors. *Mol. Neurobiol.* 26, 81–95.
- Rockwood, K., Kirkland, S., Hogan, D.B., MacKnight, C., Merry, H., Verreault, R., Wolfson, C., and McDowell, I. (2002). Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch. Neurol.* 59, 223–227.
- Rodrigues, S.F., and Granger, D.N. (2015). Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers* 3, e978720.
- Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Woods, A.S., Cotter, R.J., Gowing, E., and Ball, M.J. (1993). beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10836–10840.
- Roher, A.E., Debbins, J.P., Malek-Ahmadi, M., Chen, K., Pipe, J.G., Maze, S., Belden, C., Maarouf, C.L., Thiyyagura, P., Mo, H., et al. (2012). Cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *Vasc. Health Risk Manag.* 8, 599–611.
- Román, G.C., and Kalaria, R.N. (2006). Vascular determinants of cholinergic deficits in Alzheimer disease and vascular dementia. *Neurobiol. Aging* 27, 1769–1785.

- Román, G.C., and Royall, D.R. (1999). Executive control function: a rational basis for the diagnosis of vascular dementia. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* *13 Suppl 3*, S69-80.
- Romas, S.N., Tang, M.X., Berglund, L., and Mayeux, R. (1999). APOE genotype, plasma lipids, lipoproteins, and AD in community elderly. *Neurology* *53*, 517–521.
- Roth, M., Obaidat, A., and Hagenbuch, B. (2012). OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br. J. Pharmacol.* *165*, 1260–1287.
- Rozemuller, J.M., Eikelenboom, P., Kamphorst, W., and Stam, F.C. (1988). Lack of evidence for dysfunction of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *Neurobiol. Aging* *9*, 383–391.
- Rubinsztein, D.C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* *443*, 780–786.
- Ruitenbergh, A., den Heijer, T., Bakker, S.L.M., van Swieten, J.C., Koudstaal, P.J., Hofman, A., and Breteler, M.M.B. (2005). Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: the Rotterdam Study. *Ann. Neurol.* *57*, 789–794.
- Ruvolo, P.P. (2001). Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia* *15*, 1153–1160.
- Ryu, J.K., and McLarnon, J.G. (2009). A leaky blood-brain barrier, fibrinogen infiltration and microglial reactivity in inflamed Alzheimer's disease brain. *J. Cell. Mol. Med.* *13*, 2911–2925.
- Saez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D., and Beyer, E.C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.* *83*, 1359–1400.
- Sagare, A.P., Bell, R.D., and Zlokovic, B.V. (2013). Neurovascular defects and faulty amyloid- β vascular clearance in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* *33 Suppl 1*, S87-100.
- Saher, G., Brügger, B., Lappe-Siefke, C., Möbius, W., Tozawa, R., Wehr, M.C., Wieland, F., Ishibashi, S., and Nave, K.-A. (2005). High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat. Neurosci.* *8*, 468–475.
- Saint-Pol, J., Candela, P., Boucau, M.-C., Fenart, L., and Gosselet, F. (2013). Oxysterols decrease apical-to-basolateral transport of A β peptides via an ABCB1-mediated process in an in vitro Blood-brain barrier model constituted of bovine brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* *1517*, 1–15.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell* *11*, 4131–4142.
- Sala Frigerio, C., and De Strooper, B. (2016). Alzheimer's Disease Mechanisms and Emerging Roads to Novel Therapeutics. *Annu. Rev. Neurosci.* *39*, 57–79.
- Salloway, S., Sperling, R., Fox, N.C., Blennow, K., Klunk, W., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L.S., Porsteinsson, A.P., Ferris, S., et al. (2014). Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* *370*, 322–333.
- Salomon-Zimri, S., Boehm-Cagan, A., Liraz, O., and Michaelson, D.M. (2014). Hippocampus-related cognitive impairments in young apoE4 targeted replacement mice. *Neurodegener. Dis.* *13*, 86–92.
- Salomon-Zimri, S., Glat, M.J., Barhum, Y., Luz, I., Boehm-Cagan, A., Liraz, O., Ben-Zur, T., Offen, D., and Michaelson, D.M. (2016). Reversal of ApoE4-Driven Brain Pathology by Vascular Endothelial Growth Factor Treatment. *J. Alzheimers Dis. JAD* *53*, 1443–1458.
- Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* *91*, 443–446.
- Samuraki, M., Matsunari, I., Chen, W.-P., Yajima, K., Yanase, D., Fujikawa, A., Takeda, N., Nishimura, S., Matsuda, H., and Yamada, M. (2007). Partial volume effect-corrected FDG PET and grey matter volume loss in patients with mild Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *34*, 1658–1669.
- Sanchez-Covarrubias, L., Slosky, L.M., Thompson, B.J., Davis, T.P., and Ronaldson, P.T. (2014). Transporters at CNS Barrier Sites: Obstacles or Opportunities for Drug Delivery? *Curr. Pharm. Des.* *20*, 1422–1449.

- Sane, R., Agarwal, S., Mittapalli, R.K., and Elmquist, W.F. (2013). Saturable Active Efflux by P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein at the Blood-Brain Barrier Leads to Nonlinear Distribution of Elacridar to the Central Nervous System. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **345**, 111.
- Sano, O., Tsujita, M., Shimizu, Y., Kato, R., Kobayashi, A., Kioka, N., Remaley, A.T., Michikawa, M., Ueda, K., and Matsuo, M. (2016). ABCG1 and ABCG4 Suppress γ -Secretase Activity and Amyloid β Production. *PloS One* **11**, e0155400.
- Santoni, G., Cardinali, C., Morelli, M.B., Santoni, M., Nabissi, M., and Amantini, C. (2015). Danger- and pathogen-associated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons. *J. Neuroinflammation* **12**, 21.
- Sapp, E., Kegel, K.B., Aronin, N., Hashikawa, T., Uchiyama, Y., Tohyama, K., Bhide, P.G., Vonsattel, J.P., and DiFiglia, M. (2001). Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**, 161–172.
- Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., and Alberts, M.J. (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1467–1472.
- Saunders, N.R., Dreifuss, J.-J., Dziegielewska, K.M., Johansson, P.A., Habgood, M.D., Møllgård, K., and Bauer, H.-C. (2014). The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front. Neurosci.* **8**, 404.
- Saunders, N.R., Habgood, M.D., Møllgård, K., and Dziegielewska, K.M. (2016). The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system? *F1000Research* **5**.
- Savelieff, M.G., Lee, S., Liu, Y., and Lim, M.H. (2013). Untangling amyloid- β , tau, and metals in Alzheimer's disease. *ACS Chem. Biol.* **8**, 856–865.
- Savonenko, A., Xu, G.M., Melnikova, T., Morton, J.L., Gonzales, V., Wong, M.P.F., Price, D.L., Tang, F., Markowska, A.L., and Borchelt, D.R. (2005). Episodic-like memory deficits in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol. Dis.* **18**, 602–617.
- Sawamura, N., Morishima-Kawashima, M., Waki, H., Kobayashi, K., Kuramochi, T., Frosch, M.P., Ding, K., Ito, M., Kim, T.W., Tanzi, R.E., et al. (2000). Mutant presenilin 2 transgenic mice. A large increase in the levels of Abeta 42 is presumably associated with the low density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. *J. Biol. Chem.* **275**, 27901–27908.
- Scheibel, A.B., Duong, T.H., and Jacobs, R. (1989). Alzheimer's disease as a capillary dementia. *Ann. Med.* **21**, 103–107.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., et al. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**, 173–177.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., et al. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2**, 864–870.
- Schierle, G.S., Hansson, O., Leist, M., Nicotera, P., Widner, H., and Brundin, P. (1999). Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat. Med.* **5**, 97–100.
- Schinkel, null (1999). P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36**, 179–194.
- Schinkel, A.H., and Jonker, J.W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 3–29.

- Schinkel, A.H., Smit, J.J.M., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A.A.M., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P.J., et al. (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77, 491–502.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., and Borst, P. (1995). Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J. Clin. Invest.* 96, 1698–1705.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A., and Deemter, L. van (1996). P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest.* 97, 2517–2524.
- Schlageter, N.L., Carson, R.E., and Rapoport, S.I. (1987). Examination of blood-brain barrier permeability in dementia of the Alzheimer type with [⁶⁸Ga]EDTA and positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 7, 1–8.
- Schneider, A., Schulz-Schaeffer, W., Hartmann, T., Schulz, J.B., and Simons, M. (2006). Cholesterol depletion reduces aggregation of amyloid-beta peptide in hippocampal neurons. *Neurobiol. Dis.* 23, 573–577.
- Schwartz, M., Kipnis, J., Rivest, S., and Prat, A. (2013). How do immune cells support and shape the brain in health, disease, and aging? *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 17587–17596.
- Segev, Y., Michaelson, D.M., and Rosenblum, K. (2013). ApoE ϵ 4 is associated with eIF2 α phosphorylation and impaired learning in young mice. *Neurobiol. Aging* 34, 863–872.
- Selkoe, D.J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487–498.
- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–766.
- Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* 8, 595–608.
- Seo, H., Sonntag, K.-C., and Isacson, O. (2004). Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Ann. Neurol.* 56, 319–328.
- Sergeant, N., Delacourte, A., and Buée, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 179–197.
- Seshadri, S., Fitzpatrick, A.L., Arfan Ikram, M., DeStefano, A.L., Gudnason, V., Boada, M., Bis, J.C., Smith, A.V., Carassquillo, M.M., Charles Lambert, J., et al. (2010). Genome-wide Analysis of Genetic Loci Associated with Alzheimer's Disease. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 303, 1832–1840.
- Shah, M.N.S., Vidal, D.J.-S., Masaki, D.K., Petrovitch, D.H., Ross, D.G.W., Tilley, M.C., DeMattos, D.R.B., Tracy, D.R.P., White, D.L.R., and Launer, D.L.J. (2012). Midlife blood pressure, plasma β amyloid and the risk for Alzheimer's disease: the Honolulu Asia Aging Study. *Hypertension* 59, 780.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–842.
- Sharma, S., Prasanthi R P, J., Schommer, E., Feist, G., and Ghribi, O. (2008). Hypercholesterolemia-induced Abeta accumulation in rabbit brain is associated with alteration in IGF-1 signaling. *Neurobiol. Dis.* 32, 426–432.
- Sharom, F.J. (2014). Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. *Front. Oncol.* 4.
- Shawahna, R., Uchida, Y., Declèves, X., Ohtsuki, S., Yousif, S., Dauchy, S., Jacob, A., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P.-O., et al. (2011). Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol. Pharm.* 8, 1332–1341.
- Shepro, D., and Morel, N.M. (1993). Pericyte physiology. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 7, 1031–1038.

- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., et al. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* 106, 1489.
- Shibata, M., Lu, T., Furuya, T., Degterev, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., MacDonald, M., Yankner, B., and Yuan, J. (2006). Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J. Biol. Chem.* 281, 14474–14485.
- Shie, F.-S., Jin, L.-W., Cook, D.G., Leverenz, J.B., and LeBoeuf, R.C. (2002). Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13, 455–459.
- Shimizu, H., Ghazizadeh, M., Sato, S., Oguro, T., and Kawanami, O. (2009). Interaction between beta-amyloid protein and heparan sulfate proteoglycans from the cerebral capillary basement membrane in Alzheimer's disease. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 16, 277–282.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., and Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* 6, 1221–1228.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S. i, Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., et al. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302–305.
- Shobab, L.A., Hsiung, G.-Y.R., and Feldman, H.H. (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 4, 841–852.
- Sigurdsson, E.M., Scholtzova, H., Mehta, P.D., Frangione, B., and Wisniewski, T. (2001). Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid-beta homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 159, 439–447.
- Silverberg, G.D., Messier, A.A., Miller, M.C., Machan, J.T., Majmudar, S.S., Stopa, E.G., Donahue, J.E., and Johanson, C.E. (2010). Amyloid efflux transporter expression at the blood-brain barrier declines in normal aging. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 1034–1043.
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q.S., and Nedergaard, M. (2003). Signaling at the gliovascular interface. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 9254–9262.
- Simpson, I.A., and Vannucci, S.J. (2002). Glucose transport into brain: effects of hypoglycemia. *Diabetes Nutr. Metab.* 15, 281–284; discussion 284.
- Simpson, I.A., Chundu, K.R., Davies-Hill, T., Honer, W.G., and Davies, P. (1994). Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 35, 546–551.
- Simpson, I.A., Vannucci, S.J., DeJoseph, M.R., and Hawkins, R.A. (2001). Glucose transporter asymmetries in the bovine blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* 276, 12725–12729.
- Simpson, I.A., Carruthers, A., and Vannucci, S.J. (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1766–1791.
- Sitia, R., and Braakman, I. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426, 891–894.
- Sjögren, M., and Blennow, K. (2005). The link between cholesterol and Alzheimer's disease. *World J. Biol. Psychiatry Off. J. World Fed. Soc. Biol. Psychiatry* 6, 85–97.
- Skoog, I., Wallin, A., Fredman, P., Hesse, C., Aevarsson, O., Karlsson, I., Gottfries, C.G., and Blennow, K. (1998). A population study on blood-brain barrier function in 85-year-olds: relation to Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurology* 50, 966–971.
- Sloan, H.L., Good, M., and Dunnett, S.B. (2006). Double dissociation between hippocampal and prefrontal lesions on an operant delayed matching task and a water maze reference memory task. *Behav. Brain Res.* 171, 116–126.

- Smith, Q.R. (1996). Brain perfusion systems for studies of drug uptake and metabolism in the central nervous system. *Pharm. Biotechnol.* *8*, 285–307.
- Smith, A.J., Mayer, U., Schinkel, A.H., and Borst, P. (1998). Availability of PSC833, a substrate and inhibitor of P-glycoproteins, in various concentrations of serum. *J. Natl. Cancer Inst.* *90*, 1161–1166.
- Snyder, H.M., Corriveau, R.A., Craft, S., Faber, J.E., Greenberg, S., Knopman, D., Lamb, B.T., Montine, T., Nedergaard, M., Schaffer, C.B., et al. (2015). Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia Including Alzheimer's Disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* *11*, 710.
- Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Hodgson, M.E., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Tsuda, T., Katsuya, H., Miura, Y., Asai, K., et al. (1999). Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci. Res.* *35*, 155–164.
- Sontag, E., Luangpirom, A., Hladik, C., Mudrak, I., Ogris, E., Speciale, S., and White, C.L. (2004). Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A β Alphac enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *63*, 287–301.
- Sosa, L.J., Cáceres, A., Dupraz, S., Oksdath, M., Quiroga, S., and Lorenzo, A. (2017). The physiological role of the amyloid precursor protein as an adhesion molecule in the developing nervous system. *J. Neurochem.*
- Sperandio, S., de Belle, I., and Bredesen, D.E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 14376–14381.
- Spillantini, M.G., Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A., and Ghetti, B. (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 7737–7741.
- Spinney, L. (2014). Alzheimer's disease: The forgetting gene. *Nature* *510*, 26–28.
- Sponne, I., Fife, A., Koziel, V., Oster, T., Olivier, J.-L., and Pilot, T. (2004). Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-beta peptide. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 836–838.
- van Spronsen, F.J., Hoeksma, M., and Reijngoud, D.-J. (2009). Brain dysfunction in phenylketonuria: is phenylalanine toxicity the only possible cause? *J. Inherit. Metab. Dis.* *32*, 46–51.
- Stamatovic, S.M., Johnson, A.M., Keep, R.F., and Andjelkovic, A.V. (2016). Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers* *4*.
- Starr, J.M., Farrall, A.J., Armitage, P., McGurn, B., and Wardlaw, J. (2009). Blood-brain barrier permeability in Alzheimer's disease: a case-control MRI study. *Psychiatry Res.* *171*, 232–241.
- Stefková, J., Poledne, R., and Hubáček, J.A. (2004). ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol. Res.* *53*, 235–243.
- Stéphan, A., Laroche, S., and Davis, S. (2001). Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 5703–5714.
- Stern, L., and Gautier, R. (1918a). Le passage dans le liquide céphalo-rachidien de substances introduites dans la circulation et leur action sur le système nerveux central chez les différentes espèces animales. *C. r. Séances Société Phys. Hist. Nat. Genève* *35*, 91–94.
- Stern, L., and Gautier, R. (1918b). Passage simultané des substances dans le liquide céphalo-rachidien et dans les centres nerveux. *C. r. Séances Société Phys. Hist. Nat. Genève* *35*, 58–60.
- Stern, D., Yan, S.D., Yan, S.F., and Schmidt, A.M. (2002). Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *54*, 1615–1625.
- Storck, S.E., Meister, S., Nahrath, J., Meißner, J.N., Schubert, N., Di Spiezio, A., Baches, S., Vandenbroucke, R.E., Bouter, Y., Prikulis, I., et al. (2016). Endothelial LRP1 transports amyloid- β (1-42) across the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* *126*, 123–136.

- Strassnig, M., and Ganguli, M. (2005). About a Peculiar Disease of the Cerebral Cortex. *Psychiatry Edgmont* 2, 30–33.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1977–1981.
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Bürki, K., Frey, P., Paganetti, P.A., et al. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13287–13292.
- Sullivan, P.M., Mezdoor, H., Aratani, Y., Knouff, C., Najib, J., Reddick, R.L., Quarfordt, S.H., and Maeda, N. (1997). Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17972–17980.
- Sun, H., Dai, H., Shaik, N., and Elmquist, W.F. (2003). Drug efflux transporters in the CNS. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 83–105.
- Suzuki, K., Parker, C.C., Pentchev, P.G., Katz, D., Ghetti, B., D’Agostino, A.N., and Carstea, E.D. (1995). Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 89, 227–238.
- Swatton, J.E., Sellers, L.A., Faull, R.L.M., Holland, A., Iritani, S., and Bahn, S. (2004). Increased MAP kinase activity in Alzheimer’s and Down syndrome but not in schizophrenia human brain. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2711–2719.
- Szafraniec, M.J., Szczygieł, M., Urbanska, K., and Fiedor, L. (2014). Determinants of the activity and substrate recognition of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Drug Metab. Rev.* 46, 459–474.
- Szekely, C.A., Thorne, J.E., Zandi, P.P., Ek, M., Messias, E., Breitner, J.C.S., and Goodman, S.N. (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer’s disease: a systematic review. *Neuroepidemiology* 23, 159–169.
- Tachikawa, M., Watanabe, M., Hori, S., Fukaya, M., Ohtsuki, S., Asashima, T., and Terasaki, T. (2005). Distinct spatio-temporal expression of ABCA and ABCG transporters in the developing and adult mouse brain. *J. Neurochem.* 95, 294–304.
- Tai, L.M., Loughlin, A.J., Male, D.K., and Romero, I.A. (2009). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein restrict apical-to-basolateral permeability of human brain endothelium to amyloid-beta. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1079–1083.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2013). Mitochondrial Regulation of Cell Death. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Takasato, Y., Rapoport, S.I., and Smith, Q.R. (1984). An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am. J. Physiol.* 247, H484–493.
- Takashima, A., Murayama, M., Yasutake, K., Takahashi, H., Yokoyama, M., and Ishiguro, K. (2001). Involvement of cyclin dependent kinase5 activator p25 on tau phosphorylation in mouse brain. *Neurosci. Lett.* 306, 37–40.
- Takechi, R., Galloway, S., Pallegage-Gamarallage, M.M.S., and Mamo, J.C.L. (2008). Chylomicron amyloid-beta in the aetiology of Alzheimer’s disease. *Atheroscler. Suppl.* 9, 19–25.
- Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., et al. (1981). A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.* 17, 183–194.
- Tamagno, E., Parola, M., Bardini, P., Piccini, A., Borghi, R., Guglielmotto, M., Santoro, G., Davit, A., Danni, O., Smith, M.A., et al. (2005). Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *J. Neurochem.* 92, 628–636.
- Tang, D., Yeung, J., Lee, K.Y., Matsushita, M., Matsui, H., Tomizawa, K., Hatase, O., and Wang, J.H. (1995). An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. *J. Biol. Chem.* 270, 26897–26903.
- Tanzi, R.E., and Bertram, L. (2005). Twenty Years of the Alzheimer’s Disease Amyloid Hypothesis: A Genetic Perspective. *Cell* 120, 545–555.

- Tanzi, R.E., Kovacs, D.M., Kim, T.W., Moir, R.D., Guenette, S.Y., and Wasco, W. (1996). The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 3, 159–168.
- Tao-Cheng, J.H., Nagy, Z., and Brightman, M.W. (1987). Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J. Neurosci.* 7, 3293–3299.
- Tarasoff-Conway, J.M., Carare, R.O., Osorio, R.S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B.V., et al. (2015). Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 457–470.
- Tarr, P.T., and Edwards, P.A. (2008). ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *J. Lipid Res.* 49, 169–182.
- Tarr, P.T., Tarling, E.J., Bojanic, D.D., Edwards, P.A., and Baldán, A. (2009). Emerging new paradigms for ABCG transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 584–593.
- Taylor, J.P., Hardy, J., and Fischbeck, K.H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296, 1991–1995.
- Taylor, N.M.I., Manolaridis, I., Jackson, S.M., Kowal, J., Stahlberg, H., and Locher, K.P. (2017). Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature* 546, 504–509.
- Terwel, D., Steffensen, K.R., Verghese, P.B., Kummer, M.P., Gustafsson, J.-Å., Holtzman, D.M., and Heneka, M.T. (2011). Critical role of astroglial apolipoprotein E and liver X receptor- α expression for microglial A β phagocytosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 7049–7059.
- Thal, D.R., Griffin, W.S.T., and Braak, H. (2008). Parenchymal and vascular A β -deposition and its effects on the degeneration of neurons and cognition in Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1848–1862.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., and Willingham, M.C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7735–7738.
- Thomas, H., and Coley, H.M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* 10, 159–165.
- Thomas, A.J., Morris, C.M., Ferrier, I.N., and Kalara, R.N. (2000). Distribution of amyloid beta 42 in relation to the cerebral microvasculature in an elderly cohort with Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 903, 83–88.
- Thomsen, M.S., Birkelund, S., Burkhart, A., Stensballe, A., and Moos, T. (2017). Synthesis and deposition of basement membrane proteins by primary brain capillary endothelial cells in a murine model of the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 140, 741–754.
- Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312–1316.
- Tibbling, G., Link, H., and Ohman, S. (1977). Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 37, 385–390.
- Toledano, A., and Alvarez, M.I. (2004). Lesions and dysfunctions of the nucleus basalis as Alzheimer's disease models: general and critical overview and analysis of the long-term changes in several excitotoxic models. *Curr. Alzheimer Res.* 1, 189–214.
- de Toledo Ferraz Alves, T.C., Ferreira, L.K., Wajngarten, M., and Busatto, G.F. (2010). Cardiac disorders as risk factors for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 20, 749–763.
- Tomimoto, H., Akiguchi, I., Suenaga, T., Nishimura, M., Wakita, H., Nakamura, S., and Kimura, J. (1996). Alterations of the blood-brain barrier and glial cells in white-matter lesions in cerebrovascular and Alzheimer's disease patients. *Stroke* 27, 2069–2074.
- Tooyama, I., Kawamata, T., Akiyama, H., Kimura, H., Moestrup, S.K., Gliemann, J., Matsuo, A., and McGeer, P.L. (1995). Subcellular localization of the low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2-macroglobulin receptor) in human brain. *Brain Res.* 691, 235–238.

- Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L.O., Conway, D.E., Randi, A.M., Schwartz, M.A., Matter, K., and Balda, M.S. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J. Cell Biol.* 208, 821–838.
- de la Torre, J.C. (2006). How do heart disease and stroke become risk factors for Alzheimer's disease? *Neurol. Res.* 28, 637–644.
- Tournier, N., Saba, W., Goutal, S., Gervais, P., Valette, H., Scherrmann, J.-M., Bottlaender, M., and Cisternino, S. (2015). Influence of P-Glycoprotein Inhibition or Deficiency at the Blood–Brain Barrier on 18F-2-Fluoro-2-Deoxy-d-glucose (18F-FDG) Brain Kinetics. *AAPS J.* 17, 652–659.
- Trommer, B.L., Shah, C., Yun, S.H., Gamkrelidze, G., Pasternak, E.S., Stine, W.B., Manelli, A., Sullivan, P., Pasternak, J.F., and LaDu, M.J. (2005). ApoE isoform-specific effects on LTP: blockade by oligomeric amyloid-beta1-42. *Neurobiol. Dis.* 18, 75–82.
- Tsai, L.H., Delalle, I., Caviness, V.S., Chae, T., and Harlow, E. (1994). p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371, 419–423.
- Tseng, H.C., Zhou, Y., Shen, Y., and Tsai, L.H. (2002). A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains. *FEBS Lett.* 523, 58–62.
- Tunblad, K., Jonsson, E.N., and Hammarlund-Udenaes, M. (2003). Morphine blood-brain barrier transport is influenced by probenecid co-administration. *Pharm. Res.* 20, 618–623.
- Tuszynski, M.H., Yang, J.H., Barba, D., U, H.-S., Bakay, R.A.E., Pay, M.M., Masliah, E., Conner, J.M., Kobalka, P., Roy, S., et al. (2015). Nerve Growth Factor Gene Therapy: Activation of Neuronal Responses in Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 72, 1139–1147.
- Uehara, Y., Yamada, T., Baba, Y., Miura, S., Abe, S., Kitajima, K., Higuchi, M., Iwamoto, T., and Saku, K. (2008). ATP-binding cassette transporter G4 is highly expressed in microglia in Alzheimer's brain. *Brain Res.* 1217, 239–246.
- Ujiie, M., Dickstein, D.L., Carlow, D.A., and Jefferies, W.A. (2003). Blood-brain barrier permeability precedes senile plaque formation in an Alzheimer disease model. *Microcirc. N. Y. N* 1994 10, 463–470.
- Umeda, T., Tomiyama, T., Kitajima, E., Idomoto, T., Nomura, S., Lambert, M.P., Klein, W.L., and Mori, H. (2012). Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of A β oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. *Life Sci.* 91, 1169–1176.
- Uspenskaia, O., Liebetrau, M., Herms, J., Danek, A., and Hamann, G.F. (2004). Aging is associated with increased collagen type IV accumulation in the basal lamina of human cerebral microvessels. *BMC Neurosci.* 5, 37.
- Vähäkangas, K., and Myllynen, P. (2009). Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br. J. Pharmacol.* 158, 665–678.
- Van Dam, D., and De Deyn, P.P. (2006). Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 956–970.
- Vandenberghe, R., Riviere, M.-E., Caputo, A., Sovago, J., Maguire, R.P., Farlow, M., Marotta, G., Sanchez-Valle, R., Scheltens, P., Ryan, J.M., et al. (2017). Active A β immunotherapy CAD106 in Alzheimer's disease: A phase 2b study. *Alzheimers Dement. N. Y. N* 3, 10–22.
- Vannucci, S.J., Clark, R.R., Koehler-Stec, E., Li, K., Smith, C.B., Davies, P., Maher, F., and Simpson, I.A. (1998). Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. *Dev. Neurosci.* 20, 369–379.
- Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2006). ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J. Lipid Res.* 47, 2433–2443.
- Vaya, J., and Schipper, H.M. (2007). Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J. Neurochem.* 102, 1727–1737.
- Verhoef, L.G.G.C., Lindsten, K., Masucci, M.G., and Dantuma, N.P. (2002). Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2689–2700.

- Vetrivel, K.S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., Wong, P.C., Xu, H., and Thinakaran, G. (2004). Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J. Biol. Chem.* 279, 44945–44954.
- Viana da Silva, S., Haberl, M.G., Zhang, P., Bethge, P., Lemos, C., Gonçalves, N., Gorlewicz, A., Malezieux, M., Gonçalves, F.Q., Grosjean, N., et al. (2016). Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors. *Nat. Commun.* 7.
- Vila, M., and Przedborski, S. (2003). Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 365–375.
- Villemagne, V.L., Pike, K.E., Chételat, G., Ellis, K.A., Mulligan, R.S., Bourgeat, P., Ackermann, U., Jones, G., Szeke, C., Salvado, O., et al. (2011). Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 69, 181–192.
- Villemagne, V.L., Fodero-Tavoletti, M.T., Masters, C.L., and Rowe, C.C. (2015). Tau imaging: early progress and future directions. *Lancet Neurol.* 14, 114–124.
- Vincent, B., and Govitrapong, P. (2011). Activation of the α -secretase processing of A β PP as a therapeutic approach in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 24 Suppl 2, 75–94.
- Vinters, H.V., Secor, D.L., Read, S.L., Frazee, J.G., Tomiyasu, U., Stanley, T.M., Ferreira, J.A., and Akers, M.A. (1994). Microvasculature in brain biopsy specimens from patients with Alzheimer's disease: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Ultrastruct. Pathol.* 18, 333–348.
- Visser, C.C., Voorwinden, L.H., Crommelin, D.J.A., Danhof, M., and Boer, A.G. de (2004). Characterization and Modulation of the Transferrin Receptor on Brain Capillary Endothelial Cells. *Pharm. Res.* 21, 761–769.
- Vogelgesang, S., Cascorbi, I., Schroeder, E., Pahnke, J., Kroemer, H.K., Siegmund, W., Kunert-Keil, C., Walker, L.C., and Warzok, R.W. (2002). Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics* 12, 535–541.
- Vogelsberg-Ragaglia, V., Schuck, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2001). PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Exp. Neurol.* 168, 402–412.
- Vorbrodt, A.W., and Dobrogowska, D.H. (2003). Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 42, 221–242.
- Vrselja, Z., Brkic, H., Mrdenovic, S., Radic, R., and Curic, G. (2014). Function of circle of Willis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 578–584.
- Wada, H. (1998). Blood-brain barrier permeability of the demented elderly as studied by cerebrospinal fluid-serum albumin ratio. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* 37, 509–513.
- Wahrle, S.E., Jiang, H., Parsadanian, M., Hartman, R.E., Bales, K.R., Paul, S.M., and Holtzman, D.M. (2005). Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 280, 43236–43242.
- Wahrle, S.E., Jiang, H., Parsadanian, M., Kim, J., Li, A., Knoten, A., Jain, S., Hirsch-Reinshagen, V., Wellington, C.L., Bales, K.R., et al. (2008). Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 118, 671–682.
- Walker, L.C., and Jucker, M. (2015). Neurodegenerative Diseases: Expanding the Prion Concept. *Annu. Rev. Neurosci.* 38, 87.
- Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2001). Phosphorylation Regulates Intracellular Trafficking of β -Secretase. *J. Biol. Chem.* 276, 14634–14641.
- Wang, B., Li, H., Mutlu, S.A., Bowser, D.A., Moore, M.J., Wang, M.C., and Zheng, H. (2017). The Amyloid Precursor Protein Is a Conserved Receptor for Slit to Mediate Axon Guidance. *ENeuro* 4.

- Wang, D.-S., Lipton, R.B., Katz, M.J., Davies, P., Buschke, H., Kuslansky, G., Verghese, J., Younkin, S.G., Eckman, C., and Dickson, D.W. (2005). Decreased neprilysin immunoreactivity in Alzheimer disease, but not in pathological aging. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *64*, 378–385.
- Wang, H., Golob, E.J., and Su, M.-Y. (2006). Vascular volume and blood-brain barrier permeability measured by dynamic contrast enhanced MRI in hippocampus and cerebellum of patients with MCI and normal controls. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* *24*, 695–700.
- Wang, J., Tan, L., Wang, H.-F., Tan, C.-C., Meng, X.-F., Wang, C., Tang, S.-W., and Yu, J.-T. (2015). Anti-inflammatory drugs and risk of Alzheimer’s disease: an updated systematic review and meta-analysis. *J. Alzheimers Dis. JAD* *44*, 385–396.
- Wang, L., Schuster, G.U., Hultenby, K., Zhang, Q., Andersson, S., and Gustafsson, J.-A. (2002). Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 13878–13883.
- Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., and Tall, A.R. (2004). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9774–9779.
- Wang, N., Yvan-Charvet, L., Lütjohann, D., Mulder, M., Vanmierlo, T., Kim, T.-W., and Tall, A.R. (2008). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *22*, 1073–1082.
- Wang, S., Wang, R., Chen, L., Bennett, D.A., Dickson, D.W., and Wang, D.-S. (2010). Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer’s brain. *J. Neurochem.* *115*, 47–57.
- Wardlaw, J.M., Sandercock, P. a. G., Dennis, M.S., and Starr, J. (2003). Is breakdown of the blood-brain barrier responsible for lacunar stroke, leukoaraiosis, and dementia? *Stroke* *34*, 806–812.
- Watts, G.D.J., Wymer, J., Kovach, M.J., Mehta, S.G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M.P., and Kimonis, V.E. (2004). Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat. Genet.* *36*, 377–381.
- Wei, W., Norton, D.D., Wang, X., and Kusiak, J.W. (2002). Abeta 17-42 in Alzheimer’s disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain J. Neurol.* *125*, 2036–2043.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., and Couraud, P.-O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 842–857.
- Weller, R.O., Massey, A., Newman, T.A., Hutchings, M., Kuo, Y.M., and Roher, A.E. (1998). Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer’s disease. *Am. J. Pathol.* *153*, 725–733.
- Wellington, C.L., Walker, E.K.Y., Suarez, A., Kwok, A., Bissada, N., Singaraja, R., Yang, Y.-Z., Zhang, L.-H., James, E., Wilson, J.E., et al. (2002). ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *82*, 273–283.
- Wenk, G.L. (2003). Neuropathologic changes in Alzheimer’s disease. *J. Clin. Psychiatry* *64 Suppl 9*, 7–10.
- Wenk, G.L., Rosi, S., McGann, K., and Hauss-Wegrzyniak, B. (2002). A nitric oxide-donating flurbiprofen derivative reduces neuroinflammation without interacting with galantamine in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* *453*, 319–324.
- Whitney, K.D., Watson, M.A., Collins, J.L., Benson, W.G., Stone, T.M., Numerick, M.J., Tippin, T.K., Wilson, J.G., Winegar, D.A., and Kliever, S.A. (2002). Regulation of cholesterol homeostasis by the liver X receptors in the central nervous system. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *16*, 1378–1385.
- Whitwell, J.L., Przybelski, S.A., Weigand, S.D., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Petersen, R.C., and Jack, C.R. (2007). 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer’s disease. *Brain J. Neurol.* *130*, 1777–1786.

- Wiessner, C., Wiederhold, K.-H., Tissot, A.C., Frey, P., Danner, S., Jacobson, L.H., Jennings, G.T., Lüönd, R., Ortman, R., Reichwald, J., et al. (2011). The second-generation active A β immunotherapy CAD106 reduces amyloid accumulation in APP transgenic mice while minimizing potential side effects. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 9323–9331.
- Wijesuriya, H.C., Bullock, J.Y., Faull, R.L.M., Hladky, S.B., and Barrand, M.A. (2010). ABC efflux transporters in brain vasculature of Alzheimer's subjects. *Brain Res.* *1358*, 228–238.
- Wilhelmsen, K.C., Lynch, T., Pavlou, E., Higgins, M., and Nygaard, T.G. (1994). Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22. *Am. J. Hum. Genet.* *55*, 1159–1165.
- Wilhelmus, M.M.M., Otte-Höller, I., van Triel, J.J.J., Veerhuis, R., Maat-Schieman, M.L.C., Bu, G., de Waal, R.M.W., and Verbeek, M.M. (2007). Lipoprotein receptor-related protein-1 mediates amyloid-beta-mediated cell death of cerebrovascular cells. *Am. J. Pathol.* *171*, 1989–1999.
- Wilkens, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime Rep.* *7*, 14.
- Willis, C.L., Leach, L., Clarke, G.J., Nolan, C.C., and Ray, D.E. (2004). Reversible disruption of tight junction complexes in the rat blood-brain barrier, following transitory focal astrocyte loss. *Glia* *48*, 1–13.
- Winblad, B., Andreasen, N., Minthon, L., Floesser, A., Imbert, G., Dumortier, T., Maguire, R.P., Blennow, K., Lundmark, J., Staufenbiel, M., et al. (2012). Safety, tolerability, and antibody response of active A β immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet Neurol.* *11*, 597–604.
- Winkler, E.A., Bell, R.D., and Zlokovic, B.V. (2011). Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat. Neurosci.* *14*, 1398–1405.
- Wisniewski, H.M., and Kozlowski, P.B. (1982). Evidence for blood-brain barrier changes in senile dementia of the Alzheimer type (SDAT). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *396*, 119–129.
- Wisniewski, T., and Drummond, E. (2016). Developing Therapeutic Vaccines Against Alzheimer's Disease. *Expert Rev. Vaccines* *15*, 401–415.
- Wisniewski, T., and Sigurdsson, E.M. (2010). Murine models of Alzheimer's disease and their use in developing immunotherapies. *Biochim. Biophys. Acta* *1802*, 847–859.
- Wisniewski, T., Castaño, E.M., Golabek, A., Vogel, T., and Frangione, B. (1994). Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am. J. Pathol.* *145*, 1030–1035.
- Wolburg, H., and Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* *38*, 323–337.
- Wolf, D.S., Gearing, M., Snowdon, D.A., Mori, H., Markesbery, W.R., and Mirra, S.S. (1999). Progression of regional neuropathology in Alzheimer disease and normal elderly: findings from the Nun study. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* *13*, 226–231.
- Wolf, S.A., Boddeke, H.W.G.M., and Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* *79*, 619–643.
- Wollmer, M.A., Kapaki, E., Hersberger, M., Muntwyler, J., Brunner, F., Tsolaki, M., Akatsu, H., Kosaka, K., Michikawa, M., Molyva, D., et al. (2006). Ethnicity-dependent genetic association of ABCA2 with sporadic Alzheimer's disease. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* *141B*, 534–536.
- Wolozin, B. (2004). Cholesterol, statins and dementia. *Curr. Opin. Lipidol.* *15*, 667–672.
- Wolozin, B., and Behl, C. (2000a). Mechanisms of neurodegenerative disorders: Part 1: protein aggregates. *Arch. Neurol.* *57*, 793–796.
- Wolozin, B., and Behl, C. (2000b). Mechanisms of neurodegenerative disorders: Part 2: control of cell death. *Arch. Neurol.* *57*, 801–804.

Woodruff-Pak, D.S. (2008). Animal models of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *J. Alzheimers Dis. JAD* 15, 507–521.

World Health Organization (2006). Neurological Disorders : Public health challenges (Report).

www.alzheimer.ca About-dementia/Dementias/Down-syndrome [en ligne] <<http://www.alzheimer.ca/en>>, consulté le 05-09-2017.

www.clinicaltrials.gov Clinical Trials.gov [en ligne] <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/home>>, consulté le 21-11-2017.

www.fondation-alzheimer.org Fondation Alzheimer - Susceptibilité génétique [en ligne] <<http://www.fondation-alzheimer.org/0-Articles/65-Susceptibilite-genetique%20>>, consulté le 15-09-2017.

www.fondation-alzheimer.org Fondation Alzheimer - International Genomics of Alzheimer's Project [en ligne] <<http://www.fondation-alzheimer.org/5-L-International/33-IGAP>>, consulté le 19-09-2017.

www.francealzheimer.org France Alzheimer - Les traitements [en ligne] <<http://www.francealzheimer.org/comprendre-la-maladie/les-traitements>>, consulté le 21-11-2017.

www.frcneurodon.org (2017). Comprendre le cerveau / le cerveau malade et ses maladies neurologiques. Fédération pour la recherche sur le cerveau [en ligne] <<http://www.frcneurodon.org/comprendre-le-cerveau/le-cerveau-malade-et-ses-maladies-neurologiques/>>, consulté le 24-07-2017.

www.inserm.fr Thematique / neurosciences / Alzheimer [en ligne] <<https://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/alzheimer>>, consulté le 11-09-2017.

www.molgen.u.ac.be Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database [en ligne] <<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>>, consulté le 06-09-2017.

www.neurodegenerationresearch.eu EU Joint Programme - Neurodegenerative Disease Research.

www.neurodegenerationresearch.eu [en ligne]. <<http://www.neurodegenerationresearch.eu/about/>>, consulté le 21-07-2017.

www.taconic.com Transgenic mouse model/APOE4 [en ligne] <<https://www.taconic.com/transgenic-mouse-model/apoe4>>, consulté le 18-10-2017.

www.who.int La démence / centre des médias / Organisation mondiale de la santé [en ligne] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/fr/>>, consulté le 03-08-2017.

Wyss-Coray, T., and Mucke, L. (2002). Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35, 419–432.

Xie, R., Bouw, M.R., and Hammarlund-Udenaes, M. (2000). Modelling of the blood-brain barrier transport of morphine-3-glucuronide studied using microdialysis in the rat: involvement of probenecid-sensitive transport. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1784–1792.

Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Walker, D.G., Lue, L.-F., Beach, T.G., Sue, L.I., Woulfe, J., Xu, H., Stanimirovic, D.B., et al. (2008). Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Aβ production. *Neurobiol. Dis.* 29, 422–437.

Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Bai, J., Rasquinha, I., Smith, C., Pei, K., Walker, D., Lue, L.-F., Stanimirovic, D., et al. (2009). ABCG2 is up-regulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for Aβ1-40 peptides. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 5463.

Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S., and Zhang, J.-T. (2004). Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J. Biol. Chem.* 279, 19781–19789.

Yamada, M., and Naiki, H. (2012). Cerebral amyloid angiopathy. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 107, 41–78.

- Yamaguchi, H., Yamazaki, T., Lemere, C.A., Frosch, M.P., and Selkoe, D.J. (1992). Beta amyloid is focally deposited within the outer basement membrane in the amyloid angiopathy of Alzheimer's disease. An immunoelectron microscopic study. *Am. J. Pathol.* **141**, 249–259.
- Yamashita, K., Miyakawa, T., and Katsuragi, S. (1991). Vascular changes in the brains with Alzheimer's disease. *Jpn. J. Psychiatry Neurol.* **45**, 79–84.
- Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., et al. (1996). RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* **382**, 685–691.
- Yan, S.F., Yan, S.D., Ramasamy, R., and Schmidt, A.M. (2009). Tempering the Wrath of RAGE: An Emerging Therapeutic Strategy Against Diabetic Complications, Neurodegeneration and Inflammation. *Ann. Med.* **41**, 408–422.
- Yan, X., Hu, G., Yan, W., Chen, T., Yang, F., Zhang, X., Zhao, G., and Liu, J. (2017). Ginsenoside Rd promotes non-amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein processing by regulating phosphorylation of estrogen receptor alpha. *Life Sci.* **168**, 16–23.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 124–131.
- Yang, X., Yang, Y., Li, G., Wang, J., and Yang, E.S. (2008). Coenzyme Q10 attenuates beta-amyloid pathology in the aged transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutation. *J. Mol. Neurosci.* **34**, 165–171.
- Yates, D., and McLoughlin, D.M. (2008). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Psychiatry* **7**, 1–5.
- Ye, S., Huang, Y., Müllendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E.C., Cohen, F.E., Kuntz, I.D., Weisgraber, K.H., and Mahley, R.W. (2005). Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18700–18705.
- Yeh, W.-L., Lin, C.-J., and Fu, W.-M. (2008). Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia. *Mol. Pharmacol.* **73**, 170–177.
- Yoon, S.-S., and Jo, S.A. (2012). Mechanisms of Amyloid- β Peptide Clearance: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. *Biomol. Ther.* **20**, 245–255.
- Yousif, L.F., Di Russo, J., and Sorokin, L. (2013). Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adhes. Migr.* **7**, 101–110.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E.H., and Lenardo, M.J. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* **304**, 1500–1502.
- Zandi, P.P., and Breitner, J.C. (2001). Do NSAIDs prevent Alzheimer's disease? And, if so, why? The epidemiological evidence. *Neurobiol. Aging* **22**, 811–817.
- Zarow, C., Barron, E., Chui, H.C., and Perlmutter, L.S. (1997). Vascular basement membrane pathology and Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **826**, 147–160.
- Zhang, B., Gaiteri, C., Bodea, L.-G., Wang, Z., McElwee, J., Podtelevnikov, A.A., Zhang, C., Xie, T., Tran, L., Dobrin, R., et al. (2013). Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell* **153**, 707–720.
- Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y., and Xu, H. (2012). Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* **120 Suppl 1**, 9–21.
- Zhao, L.X., Zhou, C.J., Tanaka, A., Nakata, M., Hirabayashi, T., Amachi, T., Shioda, S., Ueda, K., and Inagaki, N. (2000). Cloning, characterization and tissue distribution of the rat ATP-binding cassette (ABC) transporter ABC2/ABCA2. *Biochem. J.* **350 Pt 3**, 865–872.
- Zhao, Z., Xiang, Z., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Stetka, B., and Pasinetti, G.M. (2007). Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **28**, 824–830.

- Zhu, S., Stavrovskaya, I.G., Drozda, M., Kim, B.Y.S., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A.S., Hartley, D.M., Wu, D.C., et al. (2002). Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417, 74–78.
- Zhu, Z.-G., Sun, M.-X., Zhang, W.-L., Wang, W.-W., Jin, Y.-M., and Xie, C.-L. (2017). The efficacy and safety of coenzyme Q10 in Parkinson's disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 38, 215–224.
- Zipser, B.D., Johanson, C.E., Gonzalez, L., Berzin, T.M., Tavares, R., Hulette, C.M., Vitek, M.P., Hovanesian, V., and Stopa, E.G. (2007). Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 28, 977–986.
- Zlokovic, B.V. (2004). Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 89, 807–811.
- Zlokovic, B.V. (2005). Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28, 202–208.
- Zlokovic, B.V. (2008). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 57, 178–201.
- Zlokovic, B.V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 723–738.
- Zlokovic, B.V., Deane, R., Sagare, A.P., Bell, R.D., and Winkler, E.A. (2010). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid β -peptide elimination from the brain. *J. Neurochem.* 115, 1077–1089.

Résumé

La barrière hémato-encéphalique (BHE), constituée par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (CECCs), est la principale interface d'échange entre le sang et le parenchyme cérébral. La présence de jonctions serrées (JS) entre les CECCs et de pompes d'efflux (protéines ABC (ATP-binding cassette)) garantissent la faible perméabilité de la BHE et la protection du cerveau vis-à-vis de substances potentiellement neurotoxiques. Cependant, cet effet barrière limite également la pénétration dans le système nerveux central (SNC) de molécules à visée cérébrale et peut ainsi être un frein à leur développement clinique. Les CECCs expriment aussi des récepteurs et transporteurs d'influx qui permettent l'entrée de molécules dans le SNC tels des nutriments. La question que nous nous posons est de savoir si des modifications de la BHE existent dans un contexte de neurodégénérescence et si ces modifications peuvent avoir des conséquences en termes de passage de la BHE de médicaments à visée cérébrale.

Le premier objectif de notre travail était d'étudier l'intégrité physique et fonctionnelle de la BHE dans le modèle p25 (modèle murin présentant une neurodégénérescence rapide et sévère associée à une hyperphosphorylation de la protéine Tau). Grâce à l'association de différentes techniques incluant la perfusion cérébrale in situ (PCIS), l'imagerie confocale et la PCR quantitative, nous avons montré que la perméabilité de la BHE n'était pas augmentée et que le réseau vasculaire n'était pas atrophié chez les souris p25. En revanche, nous avons mis en évidence, chez les souris p25, une augmentation de l'expression du collagène IV dans la lame basale suggérant son épaississement, ainsi qu'une augmentation de l'expression génique d'une protéine de JS (ZO-1). Ces deux modifications pourraient expliquer la diminution du volume vasculaire cérébral observée chez ces souris. Sur le plan fonctionnel, les souris p25 présentent une diminution du transport cérébral du glucose, une augmentation de l'expression de RAGE, l'acteur principal de l'influx cérébral du peptide amyloïde- β (A β), et une augmentation de l'expression des récepteurs et transporteurs actuellement connus pour être impliqués dans l'efflux cérébral du peptide A β et du cholestérol (Lrp1, Bcrp, Abca1, Abca2, Abcg1 et Abcg4).

Le second objectif de notre travail était d'étudier la pharmacocinétique et les caractéristiques de transport à travers la BHE d'un candidat médicament (PKRinh) à visée cérébrale, chez des souris saines et p25. Nos résultats chez la souris saine ont montré que sa partition cerveau-sang suite à son administration orale à la dose de 100 mg/kg était faible ($K_{p,u,u,brain} = 0,37$), suggérant l'existence d'un efflux actif à la BHE. L'utilisation de la technique de PCIS a permis de confirmer cette hypothèse en montrant que PKRinh était efflué au niveau de la BHE par la P-glycoprotéine (P-gp) ($K_m = 3 \mu M$, $V_{max} = 0,4 \text{ nmol/g/s}$). Cependant, PKRinh présente des caractéristiques neuropharmacocinétiques intéressantes, avec une clairance d'entrée cérébrale élevée ($Cl_{up} = 14 \mu l/g/s$) malgré un important efflux médié par la P-gp (rapport d'efflux ≈ 4). Chez les souris p25, la capacité de transport de la P-gp est significativement augmentée vis-à-vis de PKRinh ($K_m = 13 \mu M$, $V_{max} = 1,8 \text{ nmol/g/s}$), se traduisant par une diminution significative de sa Cl_{up} ($7 \mu l/g/s$).

En conclusion, ce travail de thèse confirme l'existence de modulations de la BHE dans un contexte de neurodégénérescence et d'hyperphosphorylation de Tau et démontre l'impact que ces modulations peuvent avoir sur la pénétration cérébrale d'un médicament visant à traiter les pathologies du SNC.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES, Faculté de Pharmacie de Paris

Unité Inserm UMR-S 1144 : Variabilité de Réponse aux Psychotropes

Equipe de recherche : Physiopathologie et cibles thérapeutiques de la Barrière Hémato-Encéphalique