

« C'est pas Versailles ici ! » - Une manière originale d'utiliser le système de bioluminescence HiBiT/LgBiT comme contrôle négatif pour valider la transcytose des vésicules extracellulaire à travers les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique

'Please don't shine!' - an original way to use HiBiT/LgBiT bioluminescence system as a negative control to validate extracellular vesicle transcytosis events across blood-brain barrier endothelial cells

Océane DUSAILLY¹, Emmanuel SEVIN¹, Paulo MARCELO², Johan HACHANI¹, Sophie DUBAN-DEWEER¹, Fabien GOSSELET¹, Laurence FENART¹ and Julien SAINT-POL¹

¹ Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (LBHE), Univ. Artois, UR 2465, 62300 Lens, France.

² Plateforme d'Ingénierie Cellulaire et d'Analyses des Protéines, Centre Universitaire de Recherche en Santé, Amiens, France.

De nombreuses équipes se penchent sur l'utilisation de vésicules extracellulaires (VE) circulantes à des fins de vectorisation de cargos (médicament, substance active, élément d'interférence épigénétique) aux cellules cérébrales. Le cerveau étant isolé de la circulation sanguine par la barrière hémato-encéphalique (BHE) localisée au niveau des cellules endothéliales (CE) polarisées des microvaisseaux cérébraux, cette vectorisation permettrait d'optimiser les thérapies existantes pour mieux soigner les maladies cérébrales. Cependant, les mécanismes d'interaction VE-CE ne sont pour l'heure pas connus, et le devenir des VE une fois internalisées par les CE restent également obscur.

L'objectif de ce projet est d'étudier les voies de transcytose des VE au niveau des CE de la BHE suivant deux étapes. La première étape consiste en **l'identification des ligands/récepteurs (L/R) portés par les VE et les CE** pour permettre l'endocytose/transcytose des VE. Cette étape sera menée par spectrométrie de masse et analyses protéomiques des membranes des VE et des CE, en utilisant une approche de digestion mêlant Trypsin Platinum (#VA9000) et le Prototype Surfactant 3192 pour une meilleure identification des protéines membranaires. La seconde étape consistera à **étudier le devenir des VE dans les CE selon le couple L/R utilisé**. Pour cela, des VE à façon seront produites par des cellules dendritiques, exprimeront à leur surface le R ou L d'intérêt, et porteront dans leur lumière une protéine couplée au rapporteur HiBiT. La protéine ALIX, soluble dans la lumière des VEs, sera utilisée avec pour modification l'apport d'un rapporteur HiBiT dans la partie C-terminale de la protéine ALIX (vecteur pBiT3.1-C, #N2371). Les CE seront quant à elle stablement transfectées pour exprimer l'élément LgBiT (#N2681) très affin pour le rapporteur HiBiT. Ainsi, si les VE empruntent une autre voie que celle de la transcytose, la libération de leur contenu dans les CE entraînera automatiquement la liaison HiBiT-LgBiT, et par conséquent l'émission d'une bioluminescence mesurable par un spectrophotomètre. Ceci invalidera le choix du couple L/R. En revanche, un couple L/R n'entraînant pas d'émission de bioluminescence sera sélectionné comme voie préférentielle de vectorisation de VE par transcytose, c'est-à-dire et que ces VE transitent d'un pôle à l'autre des CE sans que leur contenu soit libéré dans les CE.

Cette approche nous permettra de **mettre en lumière** les couples L/R d'intérêt pour la vectorisation de VE vers le cerveau par transcytose à travers les CE de la BHE, mais paradoxalement **sans émission de bioluminescence**, le système HiBiT-LgBiT étant détourné comme témoin « négatif ».