# Avis de Soutenance

## Monsieur Anthony TESSIER

## Biologie-Santé - Spécialité Neurosciences

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

*Ouverture de la barrière hémato-encéphalique par le mannitol en vue de la délivrance d'agents peptidiques : Étude par IRM dynamique et SRM*

dirigés par Madame Angèle VIOLA et Madame Adriana-Teodora PERLES-BARBACARU

Thèse soutenue le ***mercredi 06 décembre 2023*** à 14h30
Lieu : CEMEREM/CRMBM / UMR CNRS 7339 – TIMONE PAVILLON 3 CENTRE HOSPITALIER REGIONAL DE MARSEILLE - APHM 264 rue Saint-Pierre 13385 MARSEILLE CEDEX 05
Salle : de réunion du CEMEREM

**Composition du jury proposé**

| | | |
|---|---|---|
| Mme Angèle VIOLA | CRMBM, UMR 7339 CNRS Aix-Marseille Université | Directrice de thèse |
| Mme Adriana Teodora PERLES-BARBACARU | CRMBM, UMR 7339 CNRS Aix-Marseille Université | Co-directrice de thèse |
| M. Olivier BEUF | CREATIS, UMR 5220 CNRS - Inserm U1294/INSA Lyon | Président |
| Mme Emeline Julie RIBOT | CRMSM, UMR 5536 CNRS Université de Bordeaux | Rapporteure |
| M. Franck DESMOULINS | Inserm U1214 ToNIC Université de Toulouse | Examinateur |
| M. Franck KOBER | CRMBM | Examinateur |

**Mots-clés :** barrière hématoencéphalique,mannitol,IRM préclinique,IRM résolue en temps,Spectroscopie de résonance magnétique du proton,SynB3 fluoré,

**Résumé :**

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est imperméable à la majorité des agents diagnostiques et thérapeutiques administrés par voie systémique. Diverses méthodes permettent de perméabiliser de façon globale ou focale la BHE comme l'injection de solutions hyperosmolaires ou les ultrasons focalisés. Une approche étudiée en recherche repose sur l'emploi de peptides susceptibles de traverser la BHE. L'objectif initial de la thèse était d'étudier par IRM-19F la distribution cérébrale du peptide SynB3 fluoré pour l'utiliser ensuite comme vecteur d'un peptide ciblant une protéine gliale. Malgré une injection intracarotidienne favorisant la distribution cérébrale, SynB3 était indétectable dans le cerveau sauf lorsqu'il était co-administré avec une solution de mannitol hyperosmolaire. La délivrance d'un peptide fluoré à travers la BHE par choc osmotique et sa détection par IRM-19F in vivo est ainsi faisable. Cependant l'injection intracarotidienne est invasive et généralement

incompatible avec un suivi longitudinal des souris. L'administration intraveineuse (i.v) et intrapéritonéale (i.p) de solutions hyperosmolaires a été décrite chez l'animal, mais sans consensus sur la dose recommandée et la dynamique spatio-temporelle d'ouverture de la BHE. Nous avons étudié les effets d'une injection i.p de mannitol sur la perméabilité de la BHE, car elle est peu invasive et s'apparente à la voie veineuse. Après avoir optimisé la dose de mannitol administrée, nous avons étudié la perméabilité intrinsèque d'une BHE intègre et d'une BHE soumise à un choc osmotique par IRM en suivant l'accumulation d'un agent de contraste gadoliné de faible poids moléculaire (Gd-DOTA) injecté en i.p (et non pas en i.v) sur 2 heures. Cette étude IRM a conduit à la quantification de l'accumulation de Gd-DOTA obtenue avec et sans injection de mannitol, confirmée par une méthode indépendante, la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). Toutefois, les cartographies dynamiques IRM indiquent que la distribution et le délai d'apparition du Gd-DOTA dans le parenchyme cérébral peuvent varier selon la région, même après l'administration systémique de la solution hyperosmolaire, avec une distribution précoce dans le liquide céphalorachidien ventriculaire et une distribution finale évoquant le système glymphatique. Cette observation suggère que des mécanismes différents de la perméabilisation de la BHE pourraient être impliqués dans l'accumulation parenchymateuse de Gd-DOTA, notamment l'emprunt des voies glymphatiques, généralement étudiées pour leurs fonctions de « nettoyage » du cerveau. Au cours de ces travaux, nous avons constaté des effets délétères de la combinaison mannitol plus Gd-DOTA qui nous ont conduits à examiner par spectroscopie de résonance magnétique du proton (SRM-1H) l'impact métabolique du mannitol. Dans cette étude, nous avons pu différencier les effets de l'anesthésie à l'isoflurane de ceux induits par le traitement osmotique. Nos résultats confirment l'impact de l'anesthésie sur le métabolisme énergétique et la neurotransmission et démontrent un effet métabolique du mannitol, en l'absence de sa métabolisation, durant la phase de déshydratation tissulaire induite par le choc osmotique. Les variations des taux de créatine et d'alanine observés au cours de 2 heures de suivi pourraient indiquer une réduction de l'apport de ces acides aminés au cerveau via la circulation sanguine, peut-être en raison de modifications transitoires de la BHE où sont situés les transporteurs de ces acides aminés. L'approche IRM résolue dans le temps développée au cours de cette thèse permet d'étudier de façon non invasive la cinétique et la distribution du Gd-DOTA après administration i.p. Chez la souris, ce mode d'administration peut constituer une alternative moins invasive aux méthodes d'injections intrathécales, intraventriculaires ou intraveineuses généralement utilisées pour étudier l'effet d'une molécule sur la distribution cérébrale.

LE DOYEN

Georges LEONETTI

# Résumé

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est imperméable à la majorité des agents diagnostiques et thérapeutiques administrés par voie systémique. Diverses méthodes permettent de perméabiliser de façon globale ou focale la BHE comme l'injection de solutions hyperosmolaires ou les ultrasons focalisés. Une approche étudiée en recherche repose sur l'emploi de peptides susceptibles de traverser la BHE. L'objectif initial de la thèse était d'étudier par IRM-$^{19}$F la distribution cérébrale du peptide SynB3 fluoré pour l'utiliser ensuite comme vecteur d'un peptide ciblant une protéine gliale. Malgré une injection intracarotidienne favorisant la distribution cérébrale, SynB3 était indétectable dans le cerveau sauf lorsqu'il était co-administré avec une solution de mannitol hyperosmolaire. La délivrance d'un peptide fluoré à travers la BHE par choc osmotique et sa détection par IRM-$^{19}$F *in vivo* est ainsi faisable. Cependant l'injection intracarotidienne est invasive et généralement incompatible avec un suivi longitudinal des souris. L'administration intraveineuse (i.v) et intrapéritonéale (i.p) de solutions hyperosmolaires a été décrite chez l'animal, mais sans consensus sur la dose recommandée et la dynamique spatio-temporelle d'ouverture de la BHE. Nous avons étudié les effets d'une injection i.p de mannitol sur la perméabilité de la BHE, car elle est peu invasive et s'apparente à la voie veineuse. Après avoir optimisé la dose de mannitol administrée, nous avons étudié la perméabilité intrinsèque d'une BHE intègre et d'une BHE soumise à un choc osmotique par IRM en suivant l'accumulation d'un agent de contraste gadoliné de faible poids moléculaire (Gd-DOTA) injecté en i.p (et non pas en i.v) sur 2 heures. Cette étude IRM a conduit à la quantification de l'accumulation de Gd-DOTA obtenue avec et sans injection de mannitol, confirmée par une méthode indépendante, la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). Toutefois, les cartographies dynamiques IRM indiquent que la distribution et le délai d'apparition du Gd-DOTA dans le parenchyme cérébral peuvent varier selon la région, même après l'administration systémique de la solution hyperosmolaire, avec une distribution précoce dans le liquide céphalorachidien ventriculaire et une distribution finale évoquant le système glymphatique. Cette observation suggère que des mécanismes différents de la perméabilisation de la BHE pourraient être impliqués dans l'accumulation parenchymateuse de Gd-DOTA, notamment l'emprunt des voies glymphatiques, généralement étudiées pour leurs fonctions de « nettoyage » du cerveau. Au cours de ces travaux, nous avons constaté des effets délétères de la combinaison mannitol plus Gd-DOTA qui nous ont conduits à examiner par spectroscopie de résonance magnétique du proton (SRM-$^{1}$H) l'impact métabolique du mannitol. Dans cette étude, nous avons pu différencier les effets de l'anesthésie à l'isoflurane de ceux induits par le traitement osmotique. Nos résultats confirment l'impact de l'anesthésie sur le métabolisme énergétique et la neurotransmission et démontrent un effet métabolique du mannitol, en l'absence de sa métabolisation, durant la phase de déshydratation tissulaire induite par le choc osmotique. Les variations des taux de créatine et d'alanine observés au cours de 2 heures de suivi pourraient indiquer une réduction de l'apport de ces acides aminés au cerveau via la circulation sanguine, peut-être en raison de modifications

transitoires de la BHE où sont situés les transporteurs de ces acides aminés. L'approche IRM résolue dans le temps développée au cours de cette thèse permet d'étudier de façon non invasive la cinétique et la distribution du Gd-DOTA après administration i.p. Chez la souris, ce mode d'administration peut constituer une alternative moins invasive aux méthodes d'injections intrathécales, intraventriculaires ou intraveineuses généralement utilisées pour étudier l'effet d'une molécule sur la distribution cérébrale.

**Mots-clés :** barrière hémato-encéphalique, mannitol, perméabilité, IRM dynamique, SRM, spectroscopie de masse, peptide.

# Abstract

The blood-brain barrier (BBB) is impermeable to the majority of systemically administered diagnostic and therapeutic agents. Various methods allow global or focal permeabilization of the BBB, such as the osmotic shock induced by the injection of hyperosmolar solutions. Another approach currently being studied consists in the use of peptides which would be capable to cross the BBB alone or coupled with another molecule. The initial objective of the thesis was to study the cerebral distribution of the fluorinated SynB3 peptide by $^{19}$F-MRI to be used as a vector for a peptide targeting a glial protein. Despite intracarotid injection to optimize cerebral distribution, SynB3 was undetectable in the brain except when co-administered with a hyperosmolar mannitol solution. Thus, the delivery of a fluorinated peptide across the BBB by osmotic shock and its detection by $^{19}$F-MRI *in vivo* is feasible. However, intracarotid injection is invasive and generally incompatible with longitudinal monitoring of mice. Intravenous (i.v) and intraperitoneal (i.p) administration of hyperosmolar solutions have been described in animals, but without consensus on the recommended dose and the spatio-temporal dynamics of BBB opening. We studied the effects of an i.p. injection of mannitol on the permeability of the BBB, because it is minimally invasive and resembles the venous route. After optimizing the dose of administered mannitol, we studied the intrinsic permeability of an intact BBB and a BBB subjected to osmotic shock by monitoring the accumulation of an i.p (and not i.v) injected low molecular weight gadolinium contrast agent (Gd -DOTA) by MRI over 2 hours. This MRI study led to the quantification of Gd-DOTA accumulation obtained without and with mannitol injection, which was confirmed by an independent method, namely inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). However, dynamic MRI maps indicate a regionally varying distribution and onset of Gd-DOTA in the brain parenchyma, even after systemic administration of the hyperosmolar solution, with early distribution in the ventricular cerebrospinal fluid and a final distribution evoking the glymphatic system. This observation suggests that mechanisms distinct from BBB permeabilization could be involved in the parenchymal accumulation of Gd-DOTA, including the use of glymphatic pathways, typically studied for their brain "cleaning" functions. During this work, we observed harmful effects of the combination of mannitol and Gd-DOTA which led us to examine the metabolic impact of mannitol by proton magnetic resonance spectroscopy ($^{1}$H-MRS). In this study, we were able to differentiate the effects of isoflurane anesthesia from those induced by osmotic treatment. Our results confirm the impact of anesthesia on energy metabolism and neurotransmission and demonstrate a metabolic effect of mannitol, despite absence of its metabolism, during the phase of tissue dehydration induced by the osmotic shock. Changes in creatine and alanine levels detected during the 2-hour observation window could indicate a reduced delivery of these amino acids to the brain via the bloodstream, probably due to transient changes in the BBB where the transporters of these amino acids are located. The time-resolved MRI approach developed during this thesis allows for the non-invasive study of the kinetics and distribution of Gd-DOTA following i.p. administration. In mice, this administration mode could serve as a less invasive alternative to

the intrathecal, intraventricular or intravenous injection methods commonly used to study the effect of a molecule on cerebral distribution.

**Keywords:** blood-brain barrier, blood-brain barrier disruption, CNS delivery, MRI, peptide.