

Apport de la protéomique quantitative dans la caractérisation de transporteurs et enzymes modulant le passage des médicaments au travers de la barrière hémato-encéphalique

Aude Jacob, Xavier Declèves et Jean-Michel Scherrmann

Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacocinétique, INSERM U705 CNRS UMR8206, Neuropsychopharmacologie des Addictions, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

Auteur correspondant : Jean-Michel Scherrmann, jean-michel.scherrmann@parisdescartes.fr

Reçu le 21 mars 2012

Résumé – Depuis sa découverte au début du 20^e siècle, la barrière hémato-encéphalique (BHE) a longtemps été considérée comme une « barrière physique » limitant l'entrée dans le cerveau de composés ayant soit un haut poids moléculaire soit une forte polarité. Dans les années 50, la découverte de systèmes de transport assurant l'entrée cérébrale de composés endogènes tels que le glucose et les acides aminés a conduit à lui donner le nom de « barrière biochimique » permettant une nutrition sélective du cerveau. Depuis une vingtaine d'années, la pharmacologie des médicaments du système nerveux central s'est vue totalement reconsidérée en raison de la détection au niveau de la BHE de systèmes de transport des médicaments facilitant ou au contraire s'opposant à leur entrée dans le cerveau mais également d'enzymes du métabolisme des médicaments. Le développement de la biologie moléculaire et de méthodes analytiques extrêmement sensibles, telles que la spectrométrie de masse en tandem appliquée au dosage de protéines, a permis d'identifier non seulement la nature mais également la quantité de chacune de ces protéines au niveau de la BHE. Appliquées dans un premier temps aux modèles animaux utilisés en pharmacologie expérimentale, ces techniques ont plus récemment permis de quantifier ces transporteurs et enzymes au niveau de la BHE humaine. Une des applications possibles de ces travaux consisterait à concevoir des nouveaux médicaments en fonction de leur capacité à interagir avec ces transporteurs de manière à permettre leur vectorisation dans le cerveau.

Mots clés : Transporteurs / enzymes / barrière hémato-encéphalique / neuropharmacologie

Abstract – Recent advances in quantitative proteomics as a sensitive tool to quantify drug transporters and drug metabolizing enzymes at the human blood-brain barrier.

Since its discovery at the beginning of the 20th century, the blood-brain barrier (BBB) has been considered for a long time as a “physical barrier” able to limit brain distribution of highly molecular weight and/or polar compounds. This early concept of an anatomical barrier between the blood and the brain was supported by the finding of unique tight junctions between the brain endothelial cells so that they formed a continuous wall preventing the paracellular diffusion of solutes. In the middle of the 50's, BBB has been proposed as a “biochemical barrier” able to control the supply of brain to essential nutriment. More recently, BBB was evidenced as a key element in controlling effects of central nervous system drugs, since it plays a critical role in the uptake and efflux of drugs from the blood to the brain, or *vice versa*, hence affecting their concentrations and effects in the central nervous system (CNS). The BBB has therefore been more recently defined as a “pharmacological barrier” since the endothelial cells were found to contain a range of metabolizing enzymes and transporters that

control the rate and extent of drugs reaching the brain parenchyma via transcellular pathway. The emergence of new quantitative proteomic approaches allows quantifying these transporters and enzymes at the BBB, opening the way to identify new drugs that may be targeted to the brain.

Key words: Blood-brain barrier / enzymes / transporters / neuropharmacology

Abréviations

ABC :	<i>ATP-Binding Cassette</i>
BCRP :	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BHE :	barrière hémato-encéphalique
CYP :	cytochrome P450
γ -GT :	γ -glutamyl transpeptidase
GLUT :	transporteur du glucose
GST :	glutathion S-transférase
HAH :	hydrocarbure aromatique polycyclique
HAP :	hydrocarbure polycyclique aromatique
HUGO :	<i>Human Genome Organisation</i>
LAT :	<i>L-Aminoacid Transporter</i>
LCMSMS :	spectrométrie de masse en tandem
MDR :	<i>Multi-Drug Resistance</i>
MRM :	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MRP :	<i>Multidrug Resistance associated Protein</i>
NBD :	<i>Nucleotide Binding Domain</i>
OAT :	<i>Organic Anion Transporter</i>
OATP :	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide</i>
PAL :	phosphatase alcaline
PCB :	polychlorobiphényle
P-gp :	P-glycoprotéine
SLC :	<i>Solute Carrier</i>
TMD :	<i>TransMembrane Domain</i>

Introduction

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une structure capitale du cerveau : elle permet le maintien de l'homéostasie cérébrale indispensable au bon déroulement des différentes activités cérébrales. La BHE est constituée d'une couche continue de cellules endothéliales jointives reposant sur une lame basale incrustée de péricytes et solidement gainée par les pieds des astrocytes et les projections neuronales (figure 1). Ce système biologique complexe et dynamique constitue l'unité neurovasculaire.

Plus d'un siècle après l'introduction du concept de BHE, de très nombreuses études se sont appliquées à décrire l'organisation structurale et les diverses fonctions de cette barrière. Grâce aux progrès scientifiques dans le domaine de la génomique et de la protéomique et en particulier dans sa capacité à quantifier au niveau transcriptionnel et protéique les protéines importantes dans l'organisation structurale et fonctionnelle de la BHE, on possède à ce jour

une excellente représentation des éléments clés constituant la BHE. Les mécanismes de transport présents au niveau de la BHE jouent un rôle majeur dans la régulation et le maintien de l'homéostasie cérébrale pour de nombreuses molécules endogènes (glucose, acides aminés, électrolytes, nucléosides, fer, vitamine B1, insuline...), mais également dans la protection du cerveau vis-à-vis de l'exposition à des composés présents dans la circulation générale et potentiellement neurotoxiques. Compte tenu de la présence des jonctions serrées et de leur capacité, en condition physiologique, à s'opposer au passage paracellulaire de toute substance, la voie majeure autorisée est la voie transcellulaire pour la pénétration cérébrale d'une molécule. Différents modes de transport transcellulaire existent au niveau des cellules endothéliales des microvaisseaux de la BHE (figure 2).

La pénétration cérébrale d'un médicament dépend d'un grand nombre de facteurs dont bien évidemment en premier lieu ses caractéristiques physico-chimiques. Ainsi, on s'attend généralement à ce qu'une molécule lipophile franchisse facilement les membranes des cellules endothéliales pour atteindre le liquide extracellulaire cérébral. Cependant, un nombre significatif de molécules lipophiles, dont de nombreux médicaments, ont une perméabilité cérébrale bien plus faible que celle prédite par leur lipophilie. À l'inverse, certaines molécules hydrophiles franchissent aisément la BHE. L'explication de ces disparités entre les propriétés physico-chimiques de ces molécules qui gouvernent leur diffusion passive et leur capacité à réellement se distribuer dans le cerveau repose sur l'existence de transporteurs d'influx (entrée du sang vers le cerveau) ou d'efflux (sortie du cerveau vers le sang), présents au niveau des membranes des cellules endothéliales des microvaisseaux, qui favorisent leur passage cérébral ou au contraire s'y opposent.

Aux côtés de l'activité importante de transport existant au niveau des membranes cellulaires des faces lumineuses (sang) et ab-lumineuses (cerveau) des cellules endothéliales de la BHE, il existe une forte activité enzymatique intracellulaire lui conférant son statut de double barrière de transport et de métabolisme. Les cellules endothéliales, les péricytes, mais aussi les prolongements astrocytaires, expriment une grande variété d'enzymes. Les monoamines-oxydases et la DOPA-décarboxylase sont les premiers systèmes enzymatiques à avoir été identifiés au niveau de la BHE. Puis d'autres enzymes telles que la

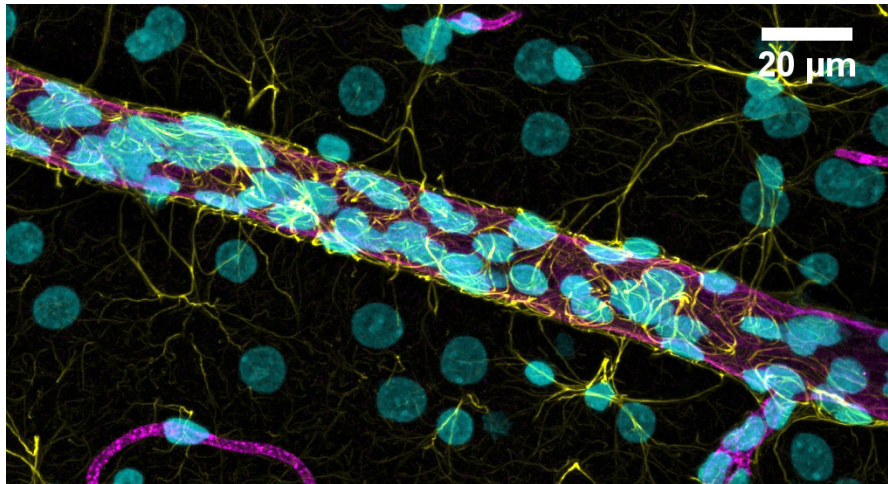


Fig. 1. Structure anatomique de la BHE. Cette image, obtenue en microscopie confocale, montre des prolongements astrocytaires entourant un vaisseau dans le cortex cérébral chez le rat. Image fournie par le Dr B. Saubaméa, plateforme d'imagerie cellulaire, Faculté de Pharmacie Paris Descartes. Cyan : ADN (noyau des cellules), jaune : GFAP ou *Glial Fibrillary Acidic Protein* (prolongements astrocytaires), magenta : P-glycoprotéine (membrane luminaire des cellules endothéliales).

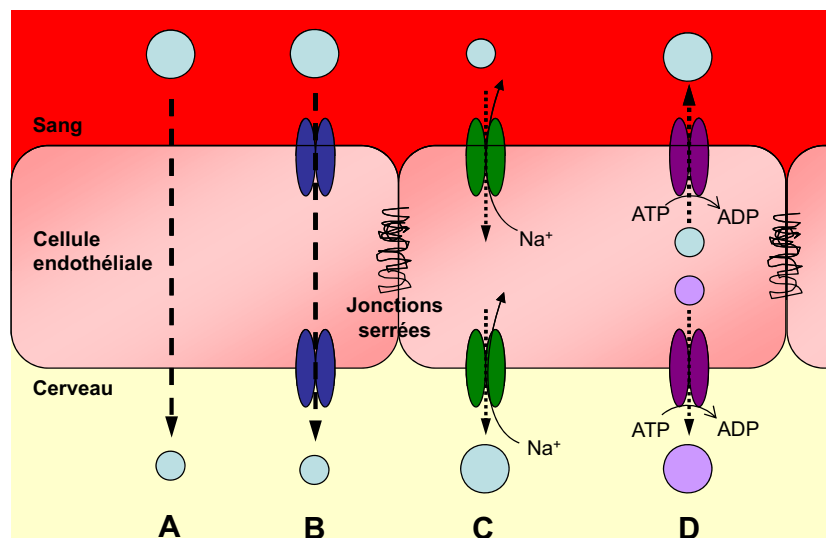


Fig. 2. Représentation schématique des modes de transport présents au niveau des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. D'après Ohtsuki & Terasaki (2007). (A) Diffusion passive, (B) Diffusion facilitée à l'aide d'un transporteur, (C) Transport actif secondaire tel qu'un antiport sodique, (D) Transport actif primaire.

γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT), les phosphatases alcalines (PAL) ou bien des enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques ont été caractérisées au niveau de cette interface. Le développement de méthodes analytiques performantes utilisant la spectrométrie de masse en tandem a récemment permis des avancées notables non seulement dans la nature des transporteurs et enzymes du métabolisme des médicaments au niveau de la BHE mais également

dans leur quantification protéique. Ces études récentes feront l'objet principal de cet article.

1 Expression des transporteurs au niveau de la BHE humaine

Deux grandes familles de transporteurs sont impliquées dans la perméabilité membranaire des cellules endothéliales cérébrales : la superfamille des

SLC transporteurs (*Solute Carrier*) et la superfamille des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*). Les transporteurs SLC comprennent un très grand nombre de protéines organisées en plusieurs familles comme GLUT-1/SLC2A1 (Transporteur du glucose), LAT-1/SLC7A5 (*L-Aminoacid Transporter*), OAT3/SLC22A8 (*Organic Anion Transporter*) ou OATP1A2/SLC21A2 (*Organic Anion Transporting Polypeptide*). Ils permettent, du fait de leur expression au niveau de la BHE, plus généralement l'entrée mais aussi la sortie sélective de molécules essentielles ou de médicaments (Kusuhara & Sugiyama, 2005). Certains membres de cette superfamille sont impliqués dans l'influx de substrats vers le cerveau par un mécanisme de diffusion facilitée (glucose, acides aminés, bases puriques...) ou de transport actif secondaire (synport ou antiport), tels que des transporteurs d'anions et de cations organiques (OATP, OAT, OCT...) (Kusuhara & Sugiyama, 2005). Les transporteurs ABC constituent une superfamille de protéines membranaires retrouvées dans tout le règne du vivant (eucaryote et procaryote) et largement conservées au cours de l'évolution (Scherrmann, 2005). Le terme de transporteur « ABC » signifiant transporteur à « *ATP-Binding Cassette* » est utilisé en raison de la capacité de ces transporteurs à hydrolyser l'ATP comme source d'énergie. Les gènes codant pour les transporteurs ABC sont regroupés en sous-familles selon leur homologie de séquences nucléotidiques et leur organisation structurale. Chez l'Homme, 49 gènes codant pour des transporteurs ABC ont été identifiés. Selon la nouvelle nomenclature HUGO (*Human Genome Organisation*), ces gènes sont regroupés en sept sous-familles baptisées de A à G. La structure protéique des transporteurs ABC comporte quatre domaines : deux domaines transmembranaires hydrophobes (TMD pour *TransMembrane Domains*) constitués chacun de six hélices transmembranaires et impliqués dans la reconnaissance des substrats, et deux domaines cytoplasmiques hydrophiles qui lient les nucléotides (NBD pour *Nucleotide Binding Domains*) tels l'ATP. Des variantes de cette structure de base (2 TMD + 2 NBD) existent : par exemple, l'ABCG2/BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*), constituée d'un seul TMD et d'un seul NBD, est un « demi-transporteur », mais qui s'homo-dimérise lors de son expression membranaire.

Les transporteurs ABC fonctionnent comme des pompes d'efflux ATP-dépendantes pour de petites molécules. Le processus d'efflux s'effectue contre le gradient de concentration grâce à l'hydrolyse de l'ATP en ADP qui fournit l'énergie nécessaire au changement de conformation du transporteur, à l'origine du processus de transport. Les transporteurs ABC s'opposent ainsi à l'accumulation intracellulaire d'une grande variété de substrats

(anions organiques, nucléosides, composés conjugués au glutathion, stéroïdes) d'origine endogène ou exogène. La P-gp (P-glycoprotéine) et la BCRP transportent un grand nombre d'anticancéreux (anthracyclines, vinca-alcaloïdes, épipodophyllotoxines, inhibiteurs de tyrosine kinase, técanes). La P-gp présente un spectre de substrats bien plus large et serait capable de transporter la moitié des médicaments existants sur le marché, tels que des médicaments utilisés en cardiologie (digoxine, dabigatran), des antihistaminiques, des opioïdes (morphine, méthadone), des anti-épileptiques (phénytoïne, carbamazépine), des psychotropes (antidépresseurs, antipsychotiques) et des antiviraux (anti-protéases du VIH). Les transporteurs ABC de la sous-famille A transportent des lipides tels que le cholestérol. Ces transporteurs ABC ont été impliqués dans l'apparition d'un phénotype de multi-résistance, baptisé MDR (*Multi-Drug Resistance*), largement documenté en cancérologie. Chez l'Homme, les transporteurs ABC sont exprimés au niveau de la membrane plasmique des cellules dans de très nombreux tissus, tels que le foie, le cœur, les reins, les poumons ou le SNC et plus particulièrement dans les tissus ayant un rôle d'interface. Leur expression, variable en fonction du tissu considéré, conditionne fortement le passage membranaire des médicaments. Les principaux transporteurs ABC exprimés au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux composant la BHE sont l'ABCB1 (P-gp, P-glycoprotéine, MDR1, *Multi-Drug Resistance Protein 1*), les ABCC4-5 (MRP4-5, *Multi-Drug Resistance associated Proteins*) et l'ABCG2 (BCRP, *Breast Cancer Resistance Protein*).

En 2008, une équipe japonaise a publié un article décrivant l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (LCMSMS) avec ionisation de type *electrospray* et celle en MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) dans le but de quantifier des protéines membranaires dans des échantillons biologiques (Kamiie *et al.*, 2008). Cette méthode nécessite l'extraction des protéines membranaires et leur hydrolyse en peptides sous l'action d'enzymes comme la trypsine et l'utilisation de peptides marqués au deutérium, employés comme étalon interne et spécifiques de la protéine d'intérêt à quantifier. La quantification protéique revient ainsi à la quantification d'une petite molécule (ici le peptide), avec des courbes de calibration et l'ajout d'un étalon interne. L'analyse simultanée de plus d'une centaine de protéines a ainsi été rendue possible par l'utilisation de cette méthode qui a par la suite été appliquée à plusieurs types d'échantillons protéiques. Récemment notre équipe, en collaboration avec des neurologues et chirurgiens de l'Hôpital Sainte-Anne, a publié la première quantification absolue de transporteurs de médicaments au niveau de la BHE humaine (figure 3), sur des microvaisseaux

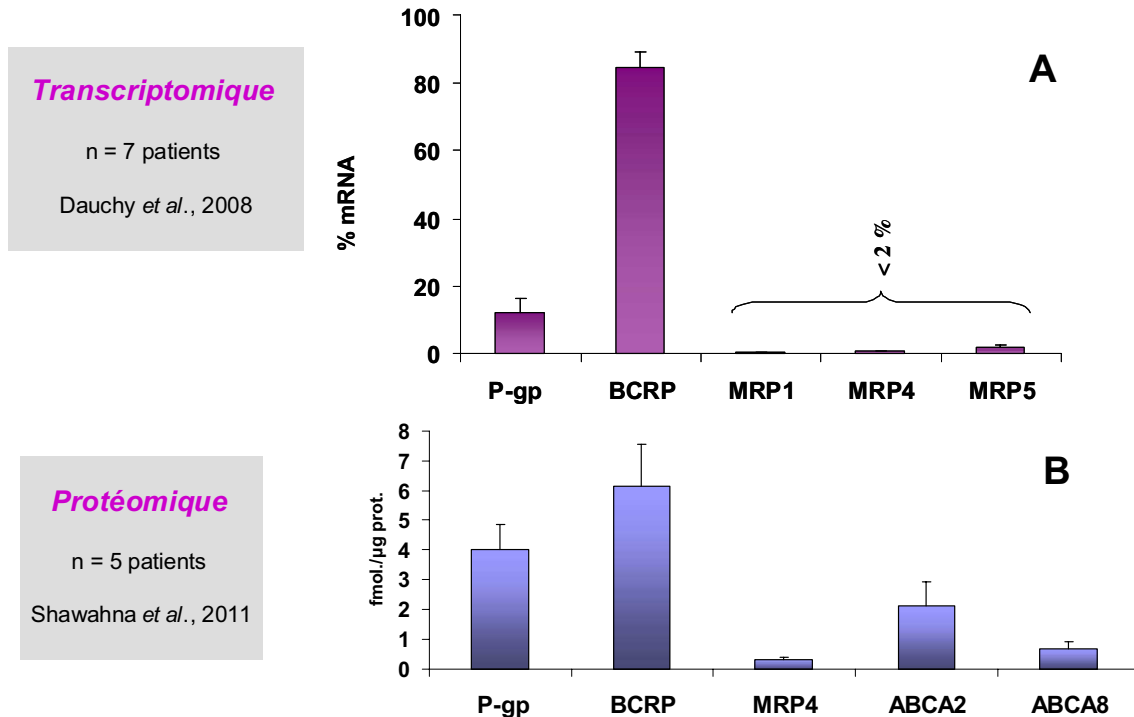


Fig. 3. Quantification des transporteurs ABC au niveau de la BHE humaine. Les ARNm (A) et les protéines (B) ont été quantifiés après isolement de microvaisseaux cérébraux de cortex à partir de biopsies cérébrales réalisées chez des patients atteints d'épilepsies rebelles ou de gliomes.

isolés à partir de biopsies cérébrales réalisées chez des patients atteints d'épilepsie rebelle ou de gliomes (Shawahna *et al.*, 2011). Nos résultats ont montré que les principaux transporteurs ABC exprimés au niveau de la BHE humaine sont la BCRP et la P-gp et que la BCRP est deux fois plus exprimée que la P-gp, ce qui semble suggérer un rôle majeur, jusque-là sous-estimé, de la BCRP dans la pénétration des médicaments dans le cerveau.

2 Expression des enzymes du métabolisme des médicaments au niveau de la BHE humaine

Il existe une importante activité enzymatique au niveau des cellules endothéliales cérébrales conférant ainsi à la BHE son statut de barrière métabolique. Les cellules endothéliales, les péricytes, mais aussi les prolongements astrocytaires, expriment une grande variété d'enzymes. Les monoamines-oxydases et la DOPA-décarboxylase sont les premiers systèmes enzymatiques à avoir été identifiés au niveau de la BHE. Puis d'autres enzymes, telles que la γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT), les phosphatases alcalines (PAL) ou bien des enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, comme

par exemple les cytochromes P450 (CYPs) ou les glutathion-S-transférases (GST), ont été caractérisées au niveau de cette interface. Les cytochromes P450 sont des mono-oxygénases possédant un noyau hème (*i.e.* hémoprotéine), capables d'incorporer un atome d'oxygène sur un substrat à partir de l'oxygène cellulaire. Initialement identifiés dans les microsomes de rat, les cytochromes P450 doivent leur nom au fait qu'ils présentent un maximum d'absorbance à 450 nm. Ces enzymes ont été classées en familles et sous-familles selon le degré d'homologie de leur séquence peptidique : les CYPs appartenant à une même famille partagent au moins 40 % d'homologie dans leur séquence d'acides aminés. Au sein d'une même sous-famille, cette homologie est supérieure à 55 %. Enfin, chaque sous-famille peut renfermer plusieurs isoformes. Chez l'Homme, la classification actuelle comporte 57 isoformes divisées en 18 familles (familles 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 17, 19, 20, 21, 24, 26, 27, 39, 46 et 51) et 43 sous-familles. Les CYPs interviennent dans la synthèse ou le catabolisme de molécules endogènes (*i.e.* acides gras, stéroïdes, cholestérol, œstrogènes, lipides eicosanoïdes...) mais sont surtout connus pour leur rôle primordial dans le métabolisme des xénobiotiques. Au cours de leur évolution, les organismes vivants ont développé des systèmes de biotransformation, de métabolisation

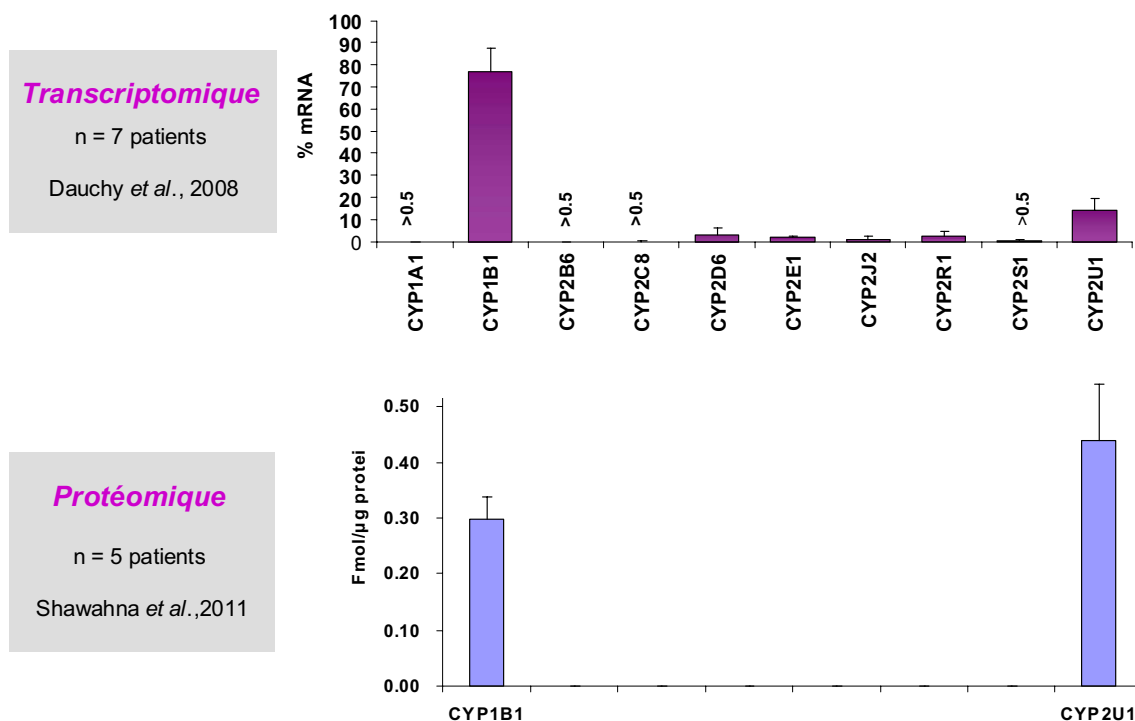


Fig. 4. Quantification des CYP450 au niveau de la BHE humaine. Les ARNm (*Transcriptomique*), et les protéines (*Protéomique*) ont été quantifiés après isolement de microvaisseaux cérébraux de cortex à partir de biopsies cérébrales réalisées chez des patients atteints d'épilepsies rebelles ou de gliomes.

et/ou de détoxification leur permettant de lutter contre l'accumulation des xénobiotiques en favorisant leur élimination.

Les xénobiotiques sont des composés de faible masse moléculaire, étrangers à l'organisme tels que les médicaments, les composants de la fumée de cigarette, les polluants atmosphériques ou les aliments. Les cytochromes P450 sont les principaux enzymes de phase I. Ils catalysent un grand nombre de réactions, la plus importante étant la réaction d'hydroxylation. Les isoformes de cytochromes P450 majoritairement impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques appartiennent aux familles 1 à 3; il s'agit des CYPs 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 et 3A4. Les cytochromes P450, localisés au niveau de la membrane externe du réticulum endoplasmique ou de la membrane (interne ou externe) des mitochondries, sont principalement exprimés dans le foie. Toutefois, certaines isoformes sont exprimées dans des tissus extra-hépatiques tels que l'intestin grêle, les poumons, les reins, le système nerveux central et notamment au niveau de la BHE.

Les principales isoformes mises en évidence dans le cerveau humain sont les suivantes : CYP1A1, CYP1B1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2, CYP2U1, CYP46A1 (Dutheil *et al.*, 2008; Declèves *et al.*, 2011). Récemment, nous avons mis en

évidence le profil d'expression des CYP450 de la BHE humaine en associant des techniques de génomique et de protéomique quantitatives (Dauchy *et al.*, 2008; Shawahna *et al.*, 2011). Dans le cas de la BHE, nos résultats ont montré que le CYP1B1 est le cytochrome P450 le plus exprimé (expression génomique relative proche de 80 %) (figure 4). Le CYP1B1 est majoritairement présent dans les tissus extra-hépatiques. Bien que le CYP1B1 soit détectable dans les tissus sains, il semble que son expression constitutive soit relativement faible. Le CYP1B1 présente cependant la particularité d'être surexprimé dans les tissus tumoraux et notamment dans les tumeurs hormonodépendantes (sein, prostate, ovaire, endomètre). Des études récentes suggèrent que le CYP1B1 serait impliqué dans le développement et la progression du processus tumoral, ce qui en fait une cible thérapeutique et diagnostique d'intérêt grandissant dans la prise en charge de ces tumeurs. Dans le cerveau, le CYP1B1 est exprimé dans les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales mais également au niveau de la BHE. À l'échelon subcellulaire, le CYP1B1 est localisé dans la membrane des mitochondries ou du réticulum endoplasmique. Contrairement aux cytochromes des familles 2 et 3 ou au CYP1A2, le CYP1B1 est peu connu pour son rôle dans le métabolisme des médicaments. La caféine, la théophylline et le

bufuralol sont les quelques rares médicaments connus pour être des substrats du CYP1B1. En revanche, le CYP1B1 se caractérise par sa grande implication dans le métabolisme des polluants environnementaux de type hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAPs) ou de type hydrocarbures aromatiques halogénés (HAHs). Les HAPs, dont l'un des plus connus est le benzo[a]pyrène, comportent au moins trois cycles aromatiques et sont présents dans les produits d'incinération, la fumée de cigarette ou les viandes barbecues carbonisées. Les HAHs, quant à eux, proviennent de contamination industrielle accidentelle (utilisation comme lubrifiant, adhésif, isolant, solvant) ou de la combustion incomplète des déchets d'incinération. Les polychlorobiphényles (PCBs) et le 2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD ou dioxine) sont les représentants les plus connus des HAHs. Certains HAPs sont des composés procarcinogènes qui, après métabolisation par le CYP1B1, sont activés en molécules très réactives pouvant former des adduits à l'ADN, à l'origine d'un processus tumoral. Les HAPs et HAHs sont par ailleurs des ligands du récepteur *aryl hydrocarbon* (AhR), facteur de transcription induisant l'expression du CYP1B1, ce qui contribue indirectement à entretenir et/ou amplifier le phénomène de tumorigénèse. Le CYP1B1 est impliqué dans le métabolisme de nombreux composés endogènes : les stéroïdes, le rétinol, la mélatonine ou l'acide arachidonique. Les dérivés eicosanoïdes, médiateurs clés de l'organisme, sont issus du métabolisme de l'acide arachidonique grâce à divers systèmes enzymatiques dont notamment celui des CYPs. Ces dérivés interviennent dans de nombreuses fonctions physiologiques : vasoconstriction/vasodilatation, bronchoconstriction/bronchodilatation, réponse inflammatoire, adhérence cellulaire, contraction musculaire, agrégation plaquettaire. Le CYP1B1 oxyde l'acide arachidonique en dérivés hydroxyl- et époxy-eicosatriénoïques, connus pour réguler l'homéostasie de l'endothélium vasculaire.

Conclusion

L'avènement de la nouvelle technologie par spectrométrie de masse appliquée au dosage de protéines membranaires a permis pour la première fois de comparer l'expression de nombreux transporteurs et enzymes au niveau de la BHE entre eux, en ayant accès à leur quantification absolue. Ces résultats prometteurs permettent de mettre en évidence les principaux mécanismes intervenant dans la régulation des échanges au niveau des interfaces sang-tissus et

notamment au niveau de la BHE. Ces progrès de la chimie analytique et de la biologie des protéines au service de la pharmacologie permettront sans aucun doute de mieux appréhender les médicaments de demain, facilitant leur acheminement dans le cerveau par des transporteurs d'influx, ou évitant leur interaction avec des transporteurs d'efflux. On peut également imaginer d'utiliser les enzymes de la BHE comme des activateurs de prodrogues qui produiraient *in situ* la formation du médicament actif grâce à leur métabolisme par ces enzymes.

Références

- Dauchy S., Dutheil F., Weaver R.J., Chassoux F., Daumas-Duport C., Couraud P.O., Scherrmann J.M., De Waziers I., Declèves X., ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors : expression at the human blood-brain barrier. *J Neurochem*, 2008, 107, 1518–1528.
- Declèves X., Jacob A., Yousif S., Shawahna R., Potin S., Scherrmann J.M., Interplay of drug metabolizing CYP450 enzymes and ABC transporters in the blood-brain barrier. *Curr Drug Metab*, 2011, 12, 732–741.
- Dutheil F., Beaune P., Lorient M.A., Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system : Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie*, 2008, 90, 426–436.
- Kamiie J., Ohtsuki S., Iwase R., Ohmine K., Katsukura Y., Yanai K., Sekine Y., Uchida Y., Ito S., Terasaki T., 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*, 2008, 25, 1469–1483.
- Kusuhara H., Sugiyama Y., Active efflux across the blood-brain barrier : role of the solute carrier family. *NeuroRx*, 2005, 2, 73–85.
- Ohtsuki S., Terasaki T., Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain ; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res*, 2007, 24, 1745–1758.
- Scherrmann J.M., Expression and function of multidrug resistance transporters at the blood-brain barriers. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2005, 1, 233–246.
- 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., Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol Pharm*, 2011, 8, 1332–1341.