

Nanoparticules pour la délivrance cérébrale de principes actifs ou d'agents de contraste. Application à la maladie d'Alzheimer

Karine Andrieux et Patrick Couvreur

Université Paris-Sud, UMR CNRS 8612, Institut Galien Paris Sud, Faculté de Pharmacie,
5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

Auteur correspondant : Karine Andrieux, karine.andrieux@u-psud.fr

Reçu le 13 décembre 2011

Résumé – Le traitement et le diagnostic des maladies cérébrales comme la maladie d'Alzheimer sont à l'heure actuelle un challenge. En effet la délivrance de molécules actives ou d'agents de contraste au niveau cérébral est rendue très difficile à cause de la perméabilité très faible de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) qui entoure et protège le cerveau. Une nouvelle stratégie pour améliorer le passage des molécules thérapeutiques à travers cette barrière est l'utilisation de vecteurs colloïdaux appelés nanoparticules. Ces objets choisis pour leur biocompatibilité et leur biodégradation présentent un devenir différent dans l'organisme en fonction de leur composition et de leur structure. L'application de ces nanoparticules au traitement et au diagnostic de la maladie d'Alzheimer est actuellement proposée par un projet européen. Les stratégies développées dans ce projet consistent à mettre au point des vecteurs capables de franchir la BHE et d'interagir avec le peptide β -amyloïde pour (1) détecter les plaques cérébrales formées, en vue d'un diagnostic de la maladie et (2) empêcher son agrégation toxique pour les neurones, en vue de proposer une nouvelle approche thérapeutique de la maladie d'Alzheimer.

Mots clés : Nanoparticules / ciblage cérébral / barrière hémato-encéphalique / maladie d'Alzheimer / peptide β -amyloïde

Abstract – Nanoparticles for brain delivery of drugs or contrast agents. Application to Alzheimer's disease.

The treatment and the diagnosis of brain diseases like Alzheimer's are nowadays a real challenge. In fact the brain delivery of drugs or contrast agents is very difficult due to the low permeability of the blood brain barrier (BBB) which is situated in brain capillaries and assures a high protection of the brain against exogenous molecules or particles. Among the different strategies that have been proposed to increase the passage of drugs through the barrier, a non-invasive one is based on the use of colloidal carriers called nanoparticles. These nanometric objects chosen for their biocompatibility and biodegradation exhibit several fates and distributions according to their composition and structures, defining the three generations of nanoparticles described up to now. The application of nanoparticles to the treatment and diagnosis of Alzheimer's disease is actually investigated in a European project. Recent studies reveal that more than 3 million people in Europe are afflicted with Alzheimer's disease. New treatments are urgently needed, as are diagnostic tests that can detect the disease earlier. The strategies developed in this project are based on the design of new carriers able to pass through the BBB and to interact with β -amyloid peptide in order to (1) detect already formed brain plaques, aiming to diagnose the disease and (2) avoid peptide

aggregation which is toxic for neurons, for the purpose of discovering a new therapeutic approach for Alzheimer's disease.

Key words: Nanoparticles / brain delivery / blood brain barrier / Alzheimer's disease / β -amyloid peptide

Glossaire

Ciblage : adressage spécifique de molécules thérapeutiques vers un tissu ou une cellule-cible en vue d'augmenter la spécificité d'action et de diminuer les effets indésirables.

Liposomes : vésicules de taille submicrométrique constituées d'une ou plusieurs bicouches concentriques de phospholipides alternant avec un ou plusieurs compartiments aqueux. L'innocuité de ces structures provient de leur composition très proche des membranes cellulaires.

Nanoparticules : particules de taille nanométrique possédant soit une structure de type matriciel (nanosphères), soit une structure de type réservoir (nanocapsules).

Opsonisation : phénomène d'épuration plasmatique de particules exogènes par les cellules immunitaires du système phagocytaire mononucléé (SPM), consécutivement à l'adsorption de protéines plasmatiques (opsonines) à la surface de ces particules.

Polymère : macromolécule chimique constituée de plusieurs unités répétitives liées entre elles par des liaisons covalentes. Certains sont biodégradables sous l'action d'enzymes de l'organisme.

Principe actif ou molécule active : molécule biologiquement active et efficace dans le traitement d'une pathologie

Vecteurs : systèmes de transport destinés à moduler la distribution d'un principe actif au sein d'un organisme.

Introduction

Actuellement le traitement et le diagnostic des maladies cérébrales comme la maladie d'Alzheimer sont inefficaces ou insuffisants alors que cette dernière maladie est un enjeu économique et social majeur dans le monde. De récentes statistiques indiquent que plus de trois millions de personnes en Europe sont atteintes par la maladie d'Alzheimer. Ce bilan devrait s'aggraver avec le vieillissement de la population. Il apparaît donc impératif de rechercher des traitements efficaces (actuellement seuls des traitements symptomatiques existent) et des diagnostics plus précoces (Brambilla *et al.*, 2011).

Les obstacles du traitement et du diagnostic des maladies cérébrales sont liés à la difficile délivrance de molécules actives ou d'agents de contraste au

niveau cérébral en raison de la perméabilité très faible de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui entoure et protège le cerveau. Une nouvelle stratégie pour améliorer le passage des molécules thérapeutiques/diagnostiques à travers cette barrière est l'utilisation de vecteurs colloïdaux appelés nanoparticules.

Cet article propose d'aborder la problématique du traitement et du diagnostic des maladies cérébrales par les nanoparticules en rappelant le rôle barrière de la BHE et en définissant les vecteurs colloïdaux. Dans une seconde partie, l'application des nanoparticules au cas particulier de la maladie d'Alzheimer sera présentée. Après un bref rappel de l'état actuel des connaissances sur cette maladie, les stratégies originales d'un projet européen en cours de réalisation seront exposées en vue de proposer de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques de la maladie d'Alzheimer à base de nanoparticules.

1 La barrière hémato-encéphalique : la difficulté de traiter les maladies cérébrales

Le traitement des maladies cérébrales est, en effet, extrêmement difficile en raison du faible passage de nombreux médicaments à travers la BHE. La perméabilité réduite de la BHE est due à la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, qui empêche la diffusion des molécules entre les cellules. Ainsi, seules les molécules lipophiles sont capables de traverser la BHE par diffusion passive, en fonction de la lipophilie de leur forme non dissociée, de leur liaison aux protéines plasmatiques et de leur poids moléculaire qui doit être inférieur à 600 Da (Garcia-Garcia *et al.*, 2005). En revanche, les substances hydrophiles ne peuvent pas traverser les parois lipidiques, à moins qu'elles ne bénéficient d'un transporteur spécifique. En conséquence, le faible passage des principes actifs risque soit de ne pas permettre d'atteindre des concentrations locales efficaces, soit d'obliger à administrer des doses importantes entraînant des effets toxiques au niveau d'autres tissus.

Différentes stratégies thérapeutiques ont été proposées pour permettre le passage des molécules peu diffusibles à travers la BHE comme, par exemple, l'administration des médicaments par des voies peu conventionnelles telle que la voie intracérébrale ou

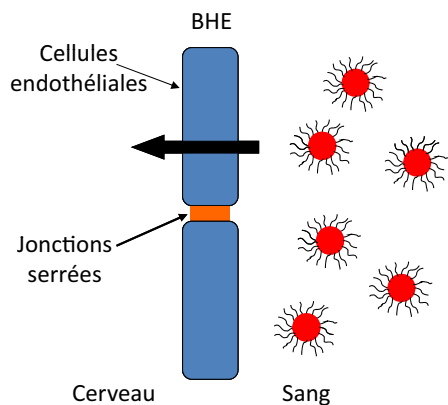


Fig. 1. Les vecteurs peuvent être utilisés pour franchir la barrière hémato-encéphalique et ainsi y transporter des molécules actives ou des agents de contraste pour proposer de nouveaux moyens thérapeutiques ou diagnostiques des maladies cérébrales.

l'injection de substances capables de perméabiliser temporairement la BHE. Ces techniques sont extrêmement traumatisantes pour le patient, donc peu utilisables chez l'Homme. Une autre stratégie consiste à modifier chimiquement les molécules actives, en augmentant leurs propriétés lipophiles ou en les conjuguant à une autre molécule fonctionnelle autorisant leur passage à travers la BHE. Cependant ces modifications peuvent changer leur répartition dans l'organisme et diminuer leur efficacité ou faire apparaître des effets secondaires inattendus.

La mise au point de nouvelles thérapies dans le traitement des maladies cérébrales comme l'Alzheimer se heurte donc au problème du passage à travers la barrière hémato-encéphalique. Le développement de vecteurs colloïdaux capables de véhiculer les principes actifs jusqu'au cerveau et aux sites de la maladie apparaît donc comme une alternative très prometteuse (figure 1).

2 Les nanoparticules : les nanotechnologies au service de la santé

2.1 Définition

S'appuyant sur de nouveaux concepts physico-chimiques et sur le développement de nouveaux matériaux (synthèse de nouveaux polymères par exemple), la recherche galénique a permis d'imaginer des systèmes d'administration sub-microniques capables : (i) de protéger la molécule active de la dégradation et (ii) d'en contrôler la libération dans le temps et dans l'espace.



Fig. 2. Les différents vecteurs : les liposomes (a) sont des vésicules formées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides ; les nanosphères (b) sont des particules formées d'une matrice de polymères et les nanocapsules (c) sont constituées d'un cœur aqueux ou huileux entouré d'une fine membrane polymère.

Plusieurs types de vecteurs colloïdaux ont été mis au point (Andrieux *et al.*, 2003). Les liposomes (figure 2a) sont des systèmes colloïdaux vésiculaires, biocompatibles et biodégradables composés d'une bicouche (liposomes unilamellaires) ou de plusieurs bicouches (liposomes multilamellaires) de phospholipides organisés en phase lamellaire et délimitant un ou plusieurs compartiments aqueux. Des principes actifs hydrophiles peuvent être encapsulés dans la phase aqueuse tandis que les molécules lipophiles se localisent dans la (les) bicouche(s). Les nanoparticules (figures 2b et 2c) sont des systèmes colloïdaux dont la structure est généralement constituée de polymères, de préférence biodégradables ou de lipides. Les nanoparticules peuvent être de type matriciel (nanosphères, figure 2b) ; dans ce cas, le principe actif peut être dispersé ou dissous dans la matrice polymère ou lipidique et être libéré par simple diffusion ou à la suite de la biodégradation dans l'organisme du matériel support. Les nanoparticules peuvent aussi être de type réservoir (nanocapsules, figure 2c) ; dans ce cas, elles sont constituées d'un noyau central généralement liquide entouré par une mince paroi de polymère ou de lipide dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques nanomètres.

2.2 Devenir dans l'organisme

Plusieurs générations de vecteurs colloïdaux sont distinguées en fonction de leur structure, qui influence

directement leur devenir dans l'organisme (Andrieux *et al.*, 2003).

Lorsque les *vecteurs de première génération* sont administrés par voie intraveineuse, les nanoparticules comme les liposomes interagissent fortement avec certaines protéines plasmatiques appelées opsonines (immunoglobulines de type G (IgG), éléments du complément, fibronectine, etc.) qui sont reconnues par des récepteurs spécifiques localisés au niveau des macrophages du système des phagocytes mononucléés (SPM) (foie, rate, moelle). Les vecteurs colloïdaux décorés d'opsonines et circulant dans le sang sont donc captés principalement par les macrophages du foie et de la rate, puis internalisés dans ces cellules où ils pourront éventuellement être dégradés. Cette distribution hépato-splénique est également favorisée par la structure histologique de l'endothélium vasculaire qui, au niveau de ces tissus, a un caractère discontinu autorisant le passage des colloïdes (liposomes et nanoparticules). La distribution tissulaire (hépato-splénique) de ces vecteurs de première génération a été mise à profit pour transporter des molécules d'intérêt thérapeutique au niveau de ces sites biologiques et traiter ainsi différentes pathologies, notamment certains cancers (hépatocarcinomes, métastases hépatiques).

Toutefois, lorsque la distribution hépatique des vecteurs nanoparticulaires n'est pas souhaitée, elle peut être évitée par leur fonctionnalisation surfacique à l'aide de polymères hydrophiles et flexibles comme les polyéthylène-glycols (PEG), les polysaccharides, les poloxamers ou les poloxamines. Ceux-ci empêchent les protéines, en particulier les opsonines, de s'adsorber à la surface de ces *nanovecteurs* dits de *deuxième génération* par un effet de répulsion stérique. Après administration intraveineuse, ces vecteurs « pegylés » (figure 3a) se caractérisent par un temps de demi-vie plasmatique prolongé et une capture hépatique réduite. Le caractère « furtif » (absence de reconnaissance par les macrophages du foie, de la rate et de la moelle osseuse) est d'autant plus prononcé que les vecteurs sont de faible taille (c'est-à-dire avec un rayon de courbure important). Ces vecteurs « furtifs », à rémanence vasculaire prolongée, ont une probabilité importante de traverser les endothéliums vasculaires caractérisés par une perméabilité accrue, comme ceux localisés au niveau des tumeurs ou des foyers infectieux où une importante inflammation est observée. Cet effet de perméabilité et de rétention tissulaire permet donc le ciblage passif de tissus tels que les tumeurs, localisés hors du territoire hépato-splénique.

Lorsque les vecteurs de deuxième génération sont décorés de ligands (anticorps, peptides, sucres, etc.) (figure 3b), ils sont alors capables de reconnaître de manière sélective des antigènes ou des récepteurs qui sont surexprimés à la surface des cellules-cibles

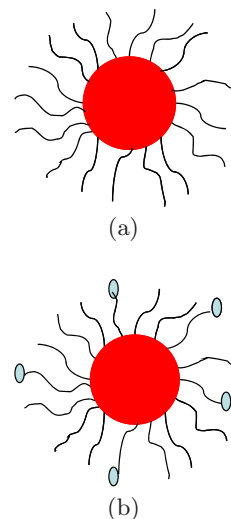


Fig. 3. Les vecteurs de deuxième génération dit « furtifs » (a) sont généralement constitués d'un vecteur classique (liposome ou nanoparticule) recouvert en surface de chaînes de polymère hydrophile et les vecteurs de troisième génération (b) présentent des ligands à l'extrémité de certaines chaînes composant les vecteurs furtifs.

(cellules cancéreuses, cellules infectées ou cellules endothéliales cérébrales). La conception de ces *vecteurs de troisième génération* nécessite donc la construction d'édifices supramoléculaires composés : (i) d'un coeur particulaire de type liposome ou nanoparticule, (ii) d'une couche de polymères hydrophiles et flexibles (par exemple le PEG) pour éviter la reconnaissance hépato-splénique et (iii) d'un ligand de reconnaissance membranaire à l'extrémité de certaines chaînes de PEG. Dans le cas particulier de l'adressage cérébral, plusieurs cibles localisées à la surface des cellules endothéliales cérébrales peuvent être mises à profit, comme le récepteur à la transferrine ou celui des LDL. Des ligands tels que la transferrine ou un anticorps dirigé contre ce récepteur ont ainsi été greffés à la surface de nanoparticules et de liposomes afin de permettre le passage de ces vecteurs à travers la barrière hémato-encéphalique. Quelques études ont d'ores et déjà démontré l'efficacité de cette stratégie (Garcia-Garcia *et al.*, 2005 ; Karatas *et al.*, 2009).

Les vecteurs de troisième génération constituent donc une avancée majeure dans la conception de nanotechnologies appliquées à la santé. Ils ouvrent des perspectives intéressantes pour le traitement des maladies cérébrales s'ils sont capables de véhiculer des molécules actives jusque dans le cerveau en passant à travers la barrière hémato-encéphalique. C'est pourquoi nous proposons d'appliquer ce concept au traitement de la maladie d'Alzheimer.

3 La maladie d'Alzheimer : un fléau grandissant en Europe

3.1 Enjeu social et économique

La maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés sont les principales causes de démences. Des statistiques récentes estiment que 24,3 millions de personnes dans le monde sont atteintes de démence aujourd'hui, avec 4,6 millions de nouveaux cas chaque année (un nouveau cas toutes les 7 s). En Europe, environ 5 millions de personnes développent une démence, dont la maladie d'Alzheimer (AD) qui touche plus de 3 millions d'entre elles. En France, le nombre de cas dépasse 860 000 chez les patients âgés de plus de 65 ans et de 32 000 chez ceux de moins de 65 ans.

Cette maladie qui touche une personne sur 20 après 65 ans et une sur 5 au-delà de 85 ans s'accompagne d'une perte progressive de l'autonomie des patients jusqu'à leur mort. Ce bilan devrait s'aggraver avec le vieillissement de la population, en doublant en Europe de l'Ouest et en triplant en Europe de l'Est dès 2040 (www.AlzheimerEurope.org).

Cette maladie constitue donc un enjeu majeur tant au niveau thérapeutique qu'au niveau économique et social pour l'Europe.

3.2 Origine de la maladie

L'état actuel des connaissances suggère que la production progressive et ensuite l'accumulation du peptide β -amyloïde ($A\beta$), un fragment de la protéine appelée *membrane-associated amyloid precursor protein* (APP), joue un rôle central dans la genèse de la maladie (Brambilla *et al.*, 2011). Ce peptide est libéré par les cellules sous une forme soluble qui va pouvoir s'agréger progressivement et former des plaques extracellulaires qui sont des caractéristiques morphologiques de la maladie, détectables dans le cerveau des malades décédés. De plus, l'accumulation dans les neurones (sous la forme de neurofibrilles) de la protéine tau anormalement hyper-phosphorylée est une autre caractéristique de la maladie, retrouvée dans les cerveaux de malades; c'est une autre cause importante de la maladie qui apparaîtrait dans un second temps.

3.3 Signes cliniques/symptômes

La maladie d'Alzheimer se caractérise par une détérioration continue des fonctions cérébrales en raison d'une dégénération neuronale progressive et irréversible (Brambilla *et al.*, 2011). On constate notamment une perte importante de neurones cholinergiques et un déficit en acétylcholine, un neurotransmetteur essentiel au fonctionnement de l'organisme. Le mode d'installation des troubles cliniques

témoigne de la progression des lésions cérébrales. Les premiers signes sont des troubles de la mémoire des faits récents. Puis apparaissent les atteintes d'autres fonctions cognitives comme l'apraxie, l'agnosie ou l'aphasie. Ceci conduit à une perte totale de l'autonomie des patients et éventuellement à la mort.

3.4 Diagnostic

Cette maladie n'est diagnostiquée que chez 50 % des patients et seuls 30 % des patients Alzheimer bénéficient d'un traitement. Pourtant, les connaissances sur la maladie ont considérablement progressé ces dernières années et devraient permettre aux praticiens de poser un diagnostic dès le début de la maladie. Une prise en charge médicale et paramédicale devrait alors être mise en place pour chaque patient diagnostiqué.

Un diagnostic précoce lorsque le patient n'est atteint que de troubles légers de la mémoire est en effet maintenant possible. Il faut pour cela réaliser une expertise neuropsychologique qui détecte les malades avec une sensibilité de 80 % et une spécificité de 90 %. D'autres outils comme l'imagerie cérébrale, les dosages de biomarqueurs après une ponction lombaire ou encore la scintigraphie cérébrale permettent de diagnostiquer des stades précoces de la maladie. Malheureusement, ces examens sont encore trop rarement pratiqués et c'est souvent à un stade plus évolué de la maladie, quand les troubles sont plus invalidants, que le diagnostic est posé.

3.5 Traitements/médicaments

Les traitements existants sont uniquement basés sur la correction du déficit en acétylcholine. Ces médicaments sont des inhibiteurs de la cholinestérase, une enzyme qui dégrade l'acétylcholine. Ils permettent donc d'augmenter la concentration en neurotransmetteur et de corriger les symptômes de la maladie. Cependant, aucun traitement n'est capable à l'heure actuelle d'empêcher la mort de nouveaux neurones (c'est-à-dire d'arrêter la progression de la maladie), ni de remplacer les neurones perdus (c'est-à-dire de guérir la maladie sans séquelles) et de nombreuses recherches sont menées dans ce but.

4 L'application des nanoparticules au traitement et au diagnostic de la maladie d'Alzheimer

L'état des connaissances actuelles suggère d'utiliser le peptide $A\beta$ comme cible principale des approches

thérapeutiques et diagnostiques. À cet égard, les nanoparticules et les liposomes offrent un outil attractif pour réussir ce challenge grâce à la possibilité d'en fonctionnaliser la surface à l'aide de molécules et/ou de ligands afin de les rendre (1) « furtives » pour prolonger leur demi-vie plasmatique, (2) capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et (3) susceptibles de cibler le peptide $A\beta$. Il est à noter que ces vecteurs ont l'avantage d'être biocompatibles, peu toxiques, faciles à préparer et qu'ils sont capables de contrôler la libération des principes actifs encapsulés.

Un projet européen (*European Community's Seventh Framework Programme*, FP7/2007-2013, n° 212043), basé sur ces idées, est actuellement en cours de réalisation (www.nadproject.eu). Ce projet repose donc sur l'utilisation de vecteurs spécifiquement conçus pour viser le peptide $A\beta$ dans le but de diagnostiquer et de traiter la maladie d'Alzheimer. Il envisage deux stratégies qui s'appliquent aussi bien aux états précoces qu'aux états avancés de la maladie :

- (1) Interagir avec le peptide $A\beta$ soluble circulant dans le sang.

Des données récentes montrent que le peptide $A\beta$ est présent à l'état soluble dans le sang et le cerveau et cet équilibre de part et d'autre de la BHE serait déplacé par la formation des plaques cérébrales. Selon cette hypothèse de travail, des nanoparticules ou des liposomes conçus pour interagir avec le peptide $A\beta$ au niveau de la circulation sanguine devraient déplacer l'équilibre vers le compartiment sanguin et empêcher le peptide de s'accumuler dans le cerveau, puis d'exercer sa toxicité vis-à-vis des neurones.

- (2) Interagir avec les différentes formes du peptide $A\beta$ (monomères, oligomères, plaques) présentes au niveau du cerveau.

L'interaction avec le peptide $A\beta$ soluble dans le cerveau pourrait empêcher son oligomérisation, et ainsi prévenir la formation des différents agrégats toxiques. De plus, l'interaction avec le peptide déjà agrégé devrait également réduire sa toxicité. Pour cela, il conviendra de concevoir des vecteurs

capables de traverser la BHE et de cibler le peptide $A\beta$ grâce à différents ligands capables de le reconnaître et de se lier à ce peptide et qui seront greffés à leur surface.

Parallèlement, la fonctionnalisation des vecteurs avec des agents de contraste pourrait permettre la détection des plaques et envisager une approche combinée diagnostique et thérapeutique, appelée « théranostique ».

Conclusion

Les nanoparticules peuvent représenter une approche prometteuse pour la délivrance cérébrale de principes actifs ou d'agents de contraste. En raison de leurs caractéristiques comme la biocompatibilité, la biodégradation et leur capacité de ciblage, elles constituent une alternative intéressante à développer pour proposer de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer.

Références

- Andrieux K., Desmaële D., D'Angelo J., Couvreur P., Nanotechnologies et nouveaux médicaments, *Actu Chim*, 2003, 269–270, 135–139.
- Brambilla D., Le Droumaguet B., Nicolas J., Hashemi S.H., Wu L.-P., Moghimi S.M., Couvreur P., Andrieux K., Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues. *Nanomed Nanotechnol Biol Med, Nanomedicine*, 2011, 7, 521–540.
- Garcia-Garcia E., Andrieux K., Gil S., Couvreur P., Colloidal carriers and Blood Brain Barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain? *Int J Pharm*, 2005, 298, 274–292.
- Karatas H., Aktas Y., Gursoy-Ozdemir Y., Bodur E., Yemisci M., Caban S., Vural A., Pinarbasli O., Capan Y., Fernandez-Megia E., Novoa-Carballal R., Riguera R., Andrieux K., Couvreur P., Dalkara T., A Nanomedicine Transports a Peptide Caspase-3 Inhibitor across the Blood-Brain Barrier and Provides Neuroprotection. *J Neurosci*, 2009, 29, 13761–13769.
- www.nadproject.eu ; www.AlzheimerEurope.org