Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique Institut Armand-Frappier

#### L'ENCAPSULATION DU CURCUMIN

## DANS DES NANOPARTICULES POLYMÉRIQUES ET BIODÉGRADABLES DE PLGA : UNE NOUVELLE STRATÉGIE THÉRAPEUTIQUE CIBLANT LA MALADIE D'ALZHEIMER

Par

Sihem Doggui

Thèse présentée pour l'obtention du grade de

Philosophiae doctor (Ph.D.) en Biologie

#### Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Examinateur externe

Examinateur externe

Directeur de recherche

Codirecteur de recherche

Pr Marc André Gauthier INRS-Énergie Matériaux et Télécommunication

Pr Karine Andrieux Université Paris -Sud

Pr Emmanuel Planel Université Laval

Pr Charles Ramassamy INRS-Institut Armand-Frappier

Pr Lé Dao INRS- Énergie Matériaux et Télécommunication

© Droits réservés de Sihem Doggui, 2014

### REMERCIEMENTS

À toutes les personnes qui m'ont soutenue durant la période de mon doctorat, je ne serais jamais arrivée jusque-là sans votre aide et votre soutien. C'est donc un grand privilège ici de vous exprimer ma profonde gratitude.

Les activités de recherche présentées dans ce manuscrit ont été réalisées au sein du prestigieux centre de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

Je remercie la Fondation Universitaire Armand-Frappier de l'INRS pour son soutien financier qui m'a permis de réaliser ce doctorat dans de bonnes conditions.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie dans un premier temps le Professeur Marc André Gauthier d'avoir accepté la présidence de ce jury. Je remercie également les Professeurs Karine Andrieux et Emmanuel Planel d'avoir accepté d'être mes examinateurs externes et d'avoir évalué mes activités de recherche. Je vous suis très reconnaissante du temps que vous avez consacré à la correction de ce manuscrit. Merci Emmanuel de t'être déplacé de Québec et merci Karine d'avoir accepté de participer à la vidéoconférence.

Je souhaite sincèrement remercier le **Professeur Lé Dao** pour ses conseils et pour m'avoir fait partager son savoir sur le monde des nanoparticules et les techniques qui y sont associées.

Une pensée particulière pour le **Professeur Michel Charbonneau** qui nous a récemment quittés. Je le remercie d'avoir étè sur mes comités de projet de thèse, d'examen de synthèse et séminaire. Ses suggestions ont toujours été pertinentes et intéressantes. Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, le **Professeur Charles Ramassamy**. Charles, je me rappelle encore le premier jour de notre rencontre autour du babyfoot, où tu m'as demandé si j'étais intéressée pour faire un doctorat et nous voilà 5 ans après, à la fin de cette thèse. Merci pour ta confiance, ton soutien et tes encouragements durant toute cette période avec ces bons et ces mauvais moments. Grâce à toi, j'ai développé une véritable autonomie dans la gestion de mon projet. Merci, de m'avoir donné « les petits trucs » pour analyser les résultats et les interpréter et aussi pour m'avoir fait aimer l'écriture (ce n'était pas gagné!). Je te remercie également pour ta patience lors de toutes mes pratiques de présentations orales. Ce doctorat ne m'a pas uniquement apporté des connaissances scientifiques, il m'a également permis de m'épanouir et de développer diverses compétences qui y sont associées. Pour tout cela, je te dis un grand MERCI !

Je tiens également à remercier mes collègues du laboratoire et particulièrement Madeleine qui m'a accueillie et appris tout ce que je sais de la culture cellulaire. Merci à Menjeet et Nam qui étaient là à mon arrivée et avec qui j'ai eu des discussions très enrichissantes. Merci à Jasjeet de m'avoir aidée à mettre au point les protocoles de caractérisations des nanoparticules. Merci aux nouveaux, Nour et Ghislain, entre nos crises, nos éclats de rire et nos discussions, c'est deux dernières années, nous avons été un vrai trio de choc dans le labo ! Merci particulièrement, pour votre soutien durant la dernière partie de mon doctorat.

Je tiens à remercier le laboratoire du Professeur Alain Fournier nos voisins de paillasse pour tout ce que je vous ai empreinté. Particulièrement, David et Myriam pour votre aide en tout temps, votre disponibilité et vos bonnes idées ! Merci d'avoir cru en moi.

Je remercie chaleureusement Mme Anne Philippon pour ses conseils et son efficacité ainsi que Pr Michel Courcelles pour avoir sauvé ma bibliothèque Endnote.

Je n'oublie pas de remercier tous les membres de l'AGEIAF avec qui j'ai vécu une très belle aventure et m'a permis de développer mon sens de l'organisation et de la gestion d'événement. Je tiens à dire merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées régulièrement à l'institut et qui ont rendu plus agréables ces années de thèse. Je ne pourrais pas nommer tout le monde, les amis se sont succédés durant ces années. Vous avez tous compté pour moi, mais j'ai une pensée particulière pour Francis, Romain, Jihene, Neda, Carolina, Hind, Jean-Christophe, Bruno, Alex, Amélie, Kathy, Marc, Joey et tous ceux que j'oublie de citer.

Asma, Cécile et Laetitia, je n'ai pas de mots assez forts pour vous remercier de tout ce que vous avez fait pour moi. Vous êtes de vraies amies toujours présentes pour m'écouter, m'encourager, m'aider et me soutenir. Grâce à vous, les derniers mois ont été plus faciles. Je vous remercie pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble.

Je remercie profondément tous mes amis qui se trouvent en France ou au Canada, sur qui j'ai toujours pu compter et qui m'ont encouragés et soutenus.

Mes derniers remerciements, mais pas des moindres, vont à ma famille. Sans vous, je ne serais pas là aujourd'hui. Vous avez toujours cru en moi, su m'encourager, et trouver le mot juste dans les moments les plus durs. Malgré la distance, vous avez vécu cette thèse quotidiennement avec moi, c'est donc un peu la vôtre. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté, je mesure la chance d'avoir des parents comme vous.

### RÉSUMÉ

La maladie d'Alzheimer touche plus de 24,3 millions d'individus dans le monde. Considérant le vieillissement de la population, ce nombre risque d'augmenter drastiquement au cours des prochaines décennies. À ce jour, il n'existe aucun traitement pouvant prévenir ou guérir cette pathologie et par conséquent d'importants efforts sont investis afin de mieux comprendre son étiologie. Un des facteurs reliés à la maladie d'Alzheimer est le stress oxydatif, qui via l'action des radicaux libres, peut endommager l'intégrité neuronale et accroitre la mortalité cellulaire. De plus, des études animales et épidémiologiques indiquent que le stress oxydatif jouerait un rôle important dans la physiopathologie précoce de la maladie. Ainsi, la réduction du stress oxydatif par l'administration d'antioxydants semble être une voie thérapeutique prometteuse. Parmi un grand nombre de produits naturels, le curcumin est une molécule d'intérêt du fait de son activité pléiotropique : antioxydante, anti-inflammatoire, anti-amyloïde et anti-phosphorylation de la protéine Tau. À cause de son hydrophobicité, le curcumin est mal absorbé par l'organisme, ce qui réduit son efficacité thérapeutique. Récemment, un intérêt considérable a été porté sur l'utilisation de nanoparticules composées d'une matrice polymérique biocompatible et biodégradable telles que le poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) afin de permettre le transport de médicaments vers le cerveau. Ainsi, une solution potentielle dans le but d'augmenter la stabilité, la solubilité, la biodisponibilité et l'internalisation du curcumin dans les neurones, serait l'encapsulation de celui-ci dans des nanoparticules. Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons premièrement préparé et caractérisé des nanoparticules vides (Nps) et encapsulant du curcumin (Nps-Cur) composées d'une matrice polymérique de PLGA, par l'utilisation de la méthode d'émulsion-évaporation de solvant. Les résultats ont montré que les Nps-Cur possèdent une morphologie sphérique et régulière et ont un diamètre compris entre 80 et 120 nm. Le pourcentage d'encapsulation du curcumin dans les Nps-Cur est de 31%. La cinétique de relargage in vitro suit un profil biphasique avec une phase de relargage exponentielle, correspondant à la libération des nanoparticules, et une phase de relargage plus lente qui correspond à la diffusion des nanoparticules à travers la matrice polymérique. Par la suite, nous avons évalué in vitro, les effets toxiques et/ou protecteurs des Nps-Cur, l'efficacité de l'encapsulation du curcumin et leur distribution cellulaire. À l'aide de la microscopie à fluorescence et confocale, nous avons démontré que les nanoparticules de curcumin étaient très

largement internalisées dans le cytoplasme et dans le noyau. Les études de cytotoxicité confirment que les nanoparticules synthétisées sont non-toxiques et qu'elles protègent contre la mort cellulaire induite par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Nous avons également démontré que les Nps-Cur sont capables de réduire, le niveau des espèces réactives de l'oxygène, l'utilisation du glutathion et l'induction du facteur de transcription sensible au potentiel cellulaire Nrf2, induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalement, nous avons modifié la matrice polymérique afin d'améliorer certains paramètres physicochimiques permettant d'augmenter l'efficacité neuroprotectrice des nanoparticules de curcumin. Nous avons alors mené une étude comparative entre deux types de nanoparticules composées d'une matrice polymérique de PLGA ayant un ratio d'acide lactique/acide glycolique de 65:35 et de 50:50. Comparativement au Nps-Cur 65:35, les Nps-Cur 50:50 ont un pourcentage d'encapsulation significativement supérieur (81%). De plus, nous avons montré que l'utilisation du polymère 50:50 améliore la cinétique de relargage du curcumin. Par conséquent, nous avons utilisé les Nps-Cur 50:50, afin d'étudier spécifiquement les mécanismes cellulaires neuroprotecteurs du curcumin contre le stress oxydatif induit par l'H2O2. Les résultats obtenus ont démontré que les Nps-Cur 50:50 sont capables d'empêcher l'induction de la voie de signalisation antioxydante, Keap1/Nrf2, d'inhiber l'activation de la voie pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B et la phosphorylation de la protéine Tau en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En conclusion, les Nps-Cur s'avèrent être un outil intéressant pour l'administration de composés bioactifs par voie orale en augmentant leurs absorptions et en réduisant leurs effets secondaires et les doses administrées. Cependant, malgré toutes les applications prometteuses des nanoparticules, il est important de prendre en considération leur potentielle toxicité qui est jusqu'à présent peu étudiée. Ce projet de recherche est particulièrement novateur du fait de l'utilisation de nanomatériaux dans un objectif thérapeutique visant la maladie d'Alzheimer et il apporte des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans la neuroprotection induite par l'encapsulation du curcumin.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS i
RÉSUMÉiv
TABLE DES MATIÈRESvi
LISTE DES TABLEAUXx
LISTE DES FIGURESxi
LISTE DES ABRÉVIATIONS xii
1 Introduction1
1.1 La maladie d'Alzheimer1
1.1.1 Généralités1
1.1.2 La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer
1.1.3 La forme héréditaire de la maladie d'Alzheimer
1.1.4 La neuropathologie de la maladie d'Alzheimer5
1.1.4.1 Les plaques séniles
1.1.4.1.1 Définition des plaques séniles
1.1.4.1.2 Formation du peptide Aβ6
1.1.4.2 Les dégénérescences fibrillaires
1.1.4.2.1 Définition des dégénérescences neurofibrillaires
1.1.4.2.2 La protéine Tau
1.1.4.3 La perte neuronale et synaptique dans la maladie d'Alzheimer
1.1.5 Les différentes hypothèses de l'apparition de la maladie d'Alzheimer11
1.1.5.1 L'hypothèse cholinergique de la maladie d'Alzheimer12
1.1.5.1.1 La synapse cholinergique12
1.1.5.1.2 Le déficit cholinergique et la maladie d'Alzheimer13
1.1.5.2 Hypothèse de la cascade amyloïde14
1.1.5.3 L'hypothèse du stress oxydatif16
1.1.5.3.1 Généralités sur le stress oxydatif17
1.1.5.3.2 Lien entre l'Aβ et le stress oxydatif24
1.1.5.3.3 Protéine Tau et le stress oxydatif25
1.1.5.3.4 L'implication du stress oxydatif dans la maladie d'Alzheimer26
1.1.6 Les voies de signalisation impliquées dans la maladie d'Alzheimer

1.1.6.1 La voie redox antioxydante Keap1/Nrf2 dans la	naladie d'Alzheimer30	
1.1.6.1.1 Interaction Keap1/Nrf2		
1.1.6.1.2 L'implication du facteur de transcription Nr	f2 dans la maladie d'Alzheimer32	
1.1.6.2 La voie Sirt 1 dans la maladie d'Alzheimer		
1.1.6.3 La voie du facteur de transcription NFκ-B dans la	a maladie d'Alzheimer34	
1.1.6.4 La voie Akt/GSK-3 dans la maladie d'Alzheimer		
1.1.7 Les traitements utilisés		
1.1.7.1 Thérapie cholinergique ciblant la maladie d'Alzh	eimer39	
1.1.7.2 Antagoniste des récepteurs NMDA (N-methyl-D-	aspartate)40	
1.1.7.3 Pharmacothérapie ciblant l'Aβ	41	
1.1.7.4 Les antioxydants		
1.1.7.4.1 Les polyphénols		
1.1.7.4.2 Activité neuroprotectrice des antioxydants.		
1.2 Le curcumin		
1.2.1 Historique : une médecine traditionnelle orienta	le pour une application médicale	
moderne		
1.2.2 Aspect pharmacologique du curcumin		
1.2.2.1 Relation structure-activité et activité antioxydan	te du curcumin52	
1.2.2.2 Effet anti-inflammatoire du curcumin		
1.2.2.3 Effet du curcumin sur la cascade amyloïde		
1.2.2.4 Effet du curcumin sur l'hyperphosphorylation de	la protéine Tau59	
1.2.2.5 Études cliniques du curcumin dans la maladie d'A	Alzheimer60	
1.2.2.6 Les limitations du curcumin	61	
1.3 Utilisation des nanoparticules comme outil dans	le traitement de la maladie	
d'Alzheimer		
1.3.1 Généralités		
132 Les nanoparticules polymériques et biodégrada	oles 68	
1.3.2.1 Les nolymères higdégradables et biocompatibles	68	
1.3.2.2 Acide poly(lactique-co-glycoligue) (PLGA)	69	
1.3.2.2.1 Le PLGA - un composé biocompatible et bioc	légradable 69	
1.3.2.2.2 Hydrolyses des nanonarticules de PLGA		
1.3.2.2.3 Différentes techniques de préparation des n	anoparticules polymériques	
biodégradables		
1.3.2.2.4 Internalisation cellulaire des nanoparticules	de PLGA75	
1.3.2.3 Propriétés physico-chimiques des nanoparticules	5	
1.3.2.4 Les principales barrières biologiques	77	

		1	.3.2.4.1	La barrière sanguine	
		1	.3.2.4.2	Absorption au niveau de la barrière gastro-intestinale des nanoparticules	
		р	olymériqu	ies biodégradables	79
		1	.3.2.4.3	Passage des nanoparticules polymériques biodégradables à travers la barrière-	
		h	émato-en	céphalique	80
		1.3.	2.5 Les	nanoparticules polymériques biodégradables développées pour le traitement dan	is la
		mala	adie d'Alz	heimer	81
		1	.3.2.5.1	Utilisation des nanoparticules afin d'augmenter la biodisponibilité et l'activité du	1
		C	urcumin		83
	1.4	Pro	oblémati	ique, hypothèses et objectifs de travail	86
2	Pu	ıblic	ations		90
	2.1	AR	TICLE 1	: L'effet neuroprotecteur du curcumin encapsulé dans des nanopartic	cules
	de F	PLGA	et son a	bsorption par les cellules humaines les SK-N-SH	90
	2.	.1.1	Résumé	de l'article 1	90
	2.	.1.2	Contrib	ution de l'étudiante	91
	2.	.1.3	Neuron	al uptake and neuroprotective effect of curcumin-loaded PLGA nanopartic	les on
	th	ie hu	man SK-l	N-SH cell line	92
	2.	.1.4	Conclus	ion de l'article 1	130
	2.2	AR	TICLE 2	: L'influence de la composition de la matrice polymérique des	
	nan	opar	ticules c	composées de PLGA sur le pourcentage d'encapsulation et le relargage	e in
	vitro	o du	curcumi	in	133
	2.	.2.1	Résumé	de l'article 2	133
	2.	2.2	Contrib	ution de l'étudiante	135
2.2.3		Stable c	urcumin-Loaded PLGA Nanoparticles suppressed Akt /Tau phosphorylatic	on	
	ar	nd en	hanced t	he anti-inflammatory and antioxidant activities of curcumin. Effet of the	
	po	olym	er compo	osition	136
	2.	2.4	Conclus	ion de l'article 2	164
2	Di	60116	sion		160
3	2.4	Scus			.107
	3.1	Op	timisatio	on des nanoparticules de PLGA encapsulant le curcumin	171
	3.2	01	mparaise	on des proprietes physico-chimiques des Nps-Cur 65:35 et des Nps-Cu	Ir
	50:5	50			172
	3.3	La	comprél	nension des interactions cellules-nanoparticules, un passage nécessai	ire à
	leur	utili	isation à	des fins thérapeutiques.	

	3.4	Mé	canismes d'internalisation cellulaire des nanoparticules de PLGA
	3.5	Qu	el est l'impact biologique de l'encapsulation du curcumin dans les nanoparticules
	PLGA	1?	
	3.6	Éva	aluation de l'effet neuroprotecteur des nanoparticules vide de PLGA188
	3.7	Qu	els sont les bénéfices liés à l'utilisation de nanoparticules dans le traitement de la
	mala	die	d'Alzheimer ?189
	3.8	Qu	elle est la meilleure stratégie d'administration des nanoparticules de curcumin ?
		••••	
	3.9	Les	s limitations de l'utilisation des nanoparticules pour un traitement contre la
	mala	die	d'Alzheimer191
4	Cor	ıclu	ision et perspectives194
5	Aut	tres	contributions
	5.1	An	nexe 1 : Le curcumin protége les cellules neuronales contre le H2O2 en restaurant
	les vo	oies	de signalisation Akt et sensibles au potentiels redox
	5.1	.1	Contribution de l'étudiante
	5.1	.2	Article: Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and
	rec	lox	signaling pathways
	5.2	An	nexe 2 : Les défis associés au curcumin dans la thérapie de la maladie d'Alzheimer
	5.2	2.1	Contribution de l'étudiante
	5.2	2.2	Revue 1: Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease
	5.3	An	nexe 3 : Application thérapeutique des nanoparticules dans la maladie
	d'Alz	heiı	ner199
	5.3	8.1	Contribution de l'étudiante
	5.3	8.2	Revue 2 : Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease 199
	5.4	Anı	nexe 4 : Article original200
	5.4	.1	Neuronal uptake and neuroprotective effect of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on
	the	e hui	man SK-N-SH cell line
	5.4	.2	Lettre de soumission de l'article 2
Ré	fére	nce	s

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 Les produits d'oxydation des principaux acides aminés (modifié de B. Berlett et Earl R. Stadtman
1997, Journal of Biological Chemistry)22
Tableau 1-2 Résumé de marqueurs de stress oxydatifs présents chez certains modèles animaux transgéniques de
la maladie d'Alzheimer
Tableau 1-3 Effets bénéfiques de certains polyphénols contre la maladie d'Alzheimer
Tableau 1-4 Biodisponibilité systémique du curcumin après son administration par voie orale chez le rat, la
souris et l'homme

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Illustration des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrilaires2
Figure 2	Formation de l'amyloïde-β à partir du clivage de l'APP7
Figure 3	Représentation schématique des six isoformes de la protéine Tau exprimées dans le cerveau humain
adulte	9
Figure 4 R	eprésentation schématique de la synapse cholinergique et de la recapture de l'acétylcholinestérase 13
Figure 5	Hypothèse de la cascade amyloïde de la maladie d'Alzheimer15
Figure 6	Formation et détoxification des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogéne
Figure 7	La voie de signalisation Keap1/Nrf2 activée par un stress oxydatif ou un composé électrophile
Figure 8	Modulation de la voie Akt dans la maladie d'Alzheimer
Figure 9	Structure chimique des curcuminoïdes (curcumin I, curcumin II et curcumin III) et de leurs
groupemer	ts réactifs (d'après Belkacemi, Doggui et Ramassamy 2010, Expert Review in Molecular Medicine)53
Figure 10 V	oie métabolique du curcumin chez le rat (d'après Belkacemi, Doggui et Ramassamy 2011, Expert
Review in N	10lecular Medicine)
Figure 11	Échelle de taille des nanoparticules en comparaison avec les principales structures de l'organisme 65
Figure 12	Structure de l'acide poly(lactique-co-glycolique)69
Figure 13	Hydrolyse du PLGA
Figure 14	Diagramme représentant les quelques techniques de préparation de nanoparticules à partir de
polymères	préformés
Figure 15	Type de nanoparticules biodégradables75
Figure 16	Représentation schématique de l'internalisation cellulaire d'agents thérapeutiques encapsulés dans
des nanopa	rticules polymériques et biodégradables de PLGA76
Figure 17	Effets des Nps 50 :50 et Nps-Cur 50 :50 sur la survie et la mortalité des cellules SK-N-SH
Figure 18	Effet du curcumin libre, des Nps 50 :50 et Nps-Cur 50 :50 sur la protéine GSK3
Figure 19	Internalisation cellulaire des Nps-Cur 65 :35 par les cellules SK-N-SH à 4°C (A) et à 37 °C (B) 182

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ААРН	2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride
ABC	Transporteurs à ATP Binding Cassette
Αβ	Amyloïde-β
Ach	Acétylcholine
AchE	Acétylcholinestérase
ADAM	Désintégrine et Métalloprotéinase A
ADN	Acide désoxyribonucléique
AICD	Domaine intracellulaire de l'APP
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
Akt	Protéine kinase B
ApoE	Apolipoprotéine E
APP	Protéine précurseur de l'Amyloïde
Aphl	Anterior pharynx defective 1
ARE	Antioxidative Responsive Element
АТР	Adénosine triphosphate
BACE-1	Sécretase- β
COX-2	Cyclooxygénase-2
DLS	Dynamic light scattering
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EGCG	Épicagalocatéchine gallate
GPx	Glutathion Peroxydase
GR	Glutathion réductase GSK-3 Glycogène synthase kinase 3

GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion-disulfure
GWAS	Génome- Wide Association Studies
γ-GSC	Gamma-glutamilcystéine synthétase
GST	Glutathion S-Transferase
Keapl	Kelch-like ECH-associated protein 1
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LRP1	Lipoprotéine de basse densité- récepteur 1
LTP	Potentialisation à long terme
LPS	Lipopolysaccharide
HNE	4-hydroxy-2-trans-nonenal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HO-1	Hème Oxygenase-1
MAPs	Microtubules associés aux protéines
МАРК	Mitogen-activated-Kinase
MCI	Mild Cognitive Impairment
MDA	Malondialdéhyde
NF-KB	Facteur nucléaire Kappa-B
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor 2
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NQO1	NADPH Quinone Oxidoreductase-1
O2 <sup>-°</sup>	Anion superoxide
Pen-2	Presenilin enhancer-2

PRX	Peroxiredoxine
PHF	Paired Helical Filament
РІЗК	Phosphatidylinositol 3-kinase
ΡΡΑRγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
PS1	Préséniline 1
PS2	Préséniline 2
PL	Poly(D,L-Lactide)
PLA	Poly(latic-acid)
PLG	Poly(D,L-glycolide)
PLGA	Poly(lactide-co-glycolide)
PCA	Poly(cyanocrylate)
PCL	Poly(e-Caproactone)
PACA	Poly(alkycyanocrylates)
PBCA	Polybutyl(cyanocrylat)
RME	Receptor mediated endocytosis
SOD	Superoxide dismutase
Sirt 1	Sirtuine 1
SMEDDS	self-microemulsifying drug delivery systems
Tau	Tubule-Associated Unit
TRX	Thioredoxine
TNFα	Tumor Necrosis Factor
UGT	UDP-Glucuronosyl -Transferase

#### **1 INTRODUCTION**

#### 1.1 La maladie d'Alzheimer

#### 1.1.1 Généralités

Les maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, augmentent avec le vieillissement de la population [1]. La maladie d'Alzheimer est la forme la plus fréquente des démences (environ 60 %) [1]. Sa prévalence est d'environ 5-10 % au-dessus de l'âge de 60 ans, et augmente considérablement jusqu'à 40-50 % au-dessus de l'âge de 85 ans. Des données du rapport mondial sur la maladie d'Alzheimer en 2010 (*Alzheimer's Disease International*), indiquent que le nombre de personnes dans le monde vivant avec une démence serait de 35,6 millions. Ce chiffre passerait à 65,7 millions en 2030 et 115,4 millions en 2050. La maladie d'Alzheimer affecte aujourd'hui plus de 24,3 millions d'individus à travers le monde, devenant l'un des fardeaux socio-économiques et médicaux les plus importants dans le monde [2]. À cet égard, l'étude *raz–de marée* réalisée par Alzheimer Canada en 2008 estime que, sur une période de 30 ans, le coût économique total cumulatif attribuable à la maladie d'Alzheimer et aux démences apparentées devrait atteindre 872 milliards. Il est donc important de bien comprendre les causes de la maladie d'Alzheimer dans le but de prévenir et de développer des traitements pharmacologiques efficaces et dépourvus d'effets secondaires.

Le Dr Alois Alzheimer identifia, pour la première fois en 1906, les deux lésions cérébrales caractéristiques de cette maladie dans des régions spécifiques du cerveau : l'hippocampe et le cortex cérébral. Ces deux lésions se manifestent, d'une part, sous forme de **plaques séniles extracellulaires** (Figure 1) qui se composent majoritairement d'un peptide, **l'amyloïde-\beta** (A $\beta$ ) et, d'autre part, d'un **enchevêtrement neurofibrillaire intracellulaire** causé par l'hyperphosphorylation de la **protéine Tau** (Figure 1). Des études ont montré que ces plaques séniles et ces enchevêtrements pourraient être la cause de la mort neuronale et la destruction massive des synapses observées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer [3]. Cela pourrait entraîner, chez les patients, l'apparition progressive de symptômes touchant notamment la mémoire (altération progressive de la mémoire épisodique), la cognition (jugement altéré, difficulté dans la prise de décision et trouble de l'orientation), la

parole (aphasie), les mouvements (apraxie) et l'agnosie. La maladie d'Alzheimer est multifactorielle, c'est-à-dire qu'elle peut être induite par des facteurs non-génétiques et des facteurs génétiques. Le principal facteur de risque non-génétique est l'âge avancé, mais d'autres facteurs peuvent être pris en compte tels que le diabète, l'hypercholestérolémie, l'obésité, le faible niveau d'éducation, une activité mentale et physique réduite, les traumatismes crâniens et les maladies cardiovasculaires, etc. [4, 5]. À ce jour, deux formes de cette maladie sont répertoriées : la forme héréditaire ou forme familiale et la forme sporadique. Le développement de la pathologie diffère dans les deux cas malgré l'apparition commune des deux types de lésions caractéristiques de la maladie et des symptômes qui s'en suivent. La maladie d'Alzheimer est aujourd'hui incurable et son origine reste inconnue.



Figure 1 Illustration des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrilaires

La flèche indique une dégénérescence neurofibrillaire (à gauche) et la structure circulaire correspond à une plaque sénile (à droite). Cette photographie au microscope montre une section de cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer marquée par la technique d'imprégnation argentique de Bielschowsky. Les dégénérescences neurofibrillaires sont intracellulaires et composées de fibrilles. Les plaques séniles sont extracellulaires et composées de dépôts d'amyloïdes entourés de neurites. L'échelle = 50  $\mu$ M [6].

#### 1.1.2 La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer

La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer correspond à la majorité des cas diagnostiqués, soit environ 90 % [7, 8]. Il est intéressant de noter que la prédominance de la pathologie double tous les 5 ans après 65 ans et approche 50 % à 85 ans [9]. De nombreuses études ont montré une augmentation de la fréquence de l'allèle ɛ4 du gène de l'apolipoprotéine E (ApoE) chez les patients atteints de la forme sporadique, lui conférant ainsi le rôle de principal facteur de risque pour cette forme de maladie. En effet, pour ce gène, le risque est multiplié par trois chez les hétérozygotes et par cinq chez les homozygotes [7, 10-12].

Chez l'homme, le gène codant pour l'ApoE est localisé sur le chromosome 19q13 [12]. L'ApoE est une protéine de 35 kDa contenant 299 acides aminés, présente sous trois variations alléliques ( $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$  et  $\epsilon_4$ ). Dans le cerveau, l'ApoE est synthétisée par les astrocytes et la microglie, mais peut aussi être produite par certains neurones. Elle joue un rôle majeur dans le transport des lipides et du cholestérol aux neurones [13, 14]. De plus, elle est impliquée dans le dépôt et la formation des plaques d'A $\beta$  et elle favorise la fibrillation d'A $\beta$  en jouant le rôle de protéine chaperonne. En effet, l'ApoE est une lipoprotéine, elle possède une forte affinité pour les récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LDLR) ainsi que pour les récepteurs LDL liés à la protéine 1 (LPP1) qui se trouve abondamment dans la membrane des neurones [15]. Ces récepteurs peuvent se fixer directement sur l'A $\beta$  [16] ou indirectement par l'intermédiaire de protéines chaperonnes liées à l'A $\beta$ . L'ApoE joue finalement un rôle crucial dans la stabilisation intracellulaire de l'A $\beta$  [17] mais aussi dans la clairance et dans la dégradation de ce peptide [18].

La forme allélique la plus commune de l'ApoE dans la population est la forme  $\varepsilon$ 3. Elle est présente chez 50 à 70 % de la population, suivie par l'allèle  $\varepsilon$ 4 (10 à 20 %) et par l'allèle  $\varepsilon$ 2 (5 à 10 %) [19]. Les trois isoformes de l'ApoE diffèrent par un ou deux acides aminés au niveau des résidus 112 et 158. Ces modifications ont un effet sur la structure et la fonction de l'ApoE [20]. Contrairement à l'allèle  $\varepsilon$ 4, la présence de l'allèle  $\varepsilon$ 2 favorise la longévité et la diminution de l'incidence des maladies cardiovasculaires et de la maladie d'Alzheimer [12]. De nombreuses études ont montré que l'allèle  $\varepsilon$ 4 affecte la progression de la maladie en provoquant la perte des cellules neuronales par 1) la modulation de l'activité cholinergique; et 2) l'accumulation des plaques d'A $\beta$  et la production d'A $\beta$  totale dans le cortex et l'hippocampe des patients atteints de la maladie d'Alzheimer [21]. De plus, l'ApoE  $\varepsilon$ 4 contribue à la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer en modulant directement le stress oxydatif, les fonctions mitochondriales, le métabolisme du glucose, l'agrégation de l'A $\beta$  et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau [21]. En conclusion, l'ApoE  $\epsilon$ 4 joue un rôle prédominant dans la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer.

Bien que jusqu'à présent le principal facteur de risque génétique de la maladie d'Alzheimer est l'ApoE ɛ4, l'émergence de récentes études d'association pangénomique (ou *Genome- Wide Association Studies* (GWAS)) et la méta-analyse systématique de la banque de données AlzGene, ont permis d'identifier des gènes qui pourraient contribuer à la maladie d'Alzheimer [22, 23]. En effet, ces études permettent l'analyse de nombreuses variations alléliques ou génétiques chez un large spectre d'individus (sujets sains versus sujets malades) afin d'étudier la corrélation avec des traits phénotypiques. Citons notament les gènes les suivants : l'ApoE, clusterin/ Apolipoprotéine J (CLU/ApoJ), le complément du récepteur 1 (CR1), metalloprotréase desintégrine 12 (ADAM 12), CSF1 et TNF [24-26] etc.

#### 1.1.3 La forme héréditaire de la maladie d'Alzheimer

Les patients atteints de la maladie d'Alzheimer sous forme héréditaire possèdent des gènes connus et inconnus avant des mutations spécifiques [27]. À l'inverse de la maladie d'Alzheimer sous forme sporadique, la forme héréditaire est très peu fréquente et elle représente uniquement 10 % des cas. Des mutations majoritairement non-sens ont été répertoriées sur le gène de la préséniline 1 (PS1) situé sur le chromosome 14 [28], le gène de la préséniline 2 (PS2) situé sur le chromosome 1 [29] et le gène de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) situé sur le chromosome 21 [30]. Il existe 197 mutations pour le gène PS1, 25 pour le gène PS2 et 40 mutations pour le gène de l'APP. Ces mutations sont détaillées dans la base de donnée de Alzheimer Disease and Frontotemporal Dementia **Mutation** Database (http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/). Ces gènes mutés causent la pathologie avec un patron autosomal dominant [28] et, contrairement à la forme sporadique, la forme héréditaire est caractérisée par l'apparition précoce des symptômes, entre l'âge de 30 et 65 ans.

#### 1.1.4 La neuropathologie de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une dégénérescence massive et graduelle des neurones et des liaisons synaptiques principalement dans le cortex, l'hippocampe et d'autres régions sous-corticales connues pour être impliquées dans l'apprentissage et la mémoire [31, 32]. L'étude *post mortem* de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a permis aux neuro-pathologistes de mettre en évidence deux types de lésions présentes essentiellement au niveau de l'hippocampe et du cortex : les **plaques séniles** et les **dégénérescences neurofibrillaires**. Cela confirme donc les observations précédemment décrites par le Dr Alois Alzheimer. L'accumulation extracellulaire d'A $\beta$  et les dégénérescences neurofibrillaires dans le cerveau s'avèrent donc être des mécanismes centraux de la pathogénie de la maladie d'Alzheimer. Ces deux lésions représentent des possibles cibles thérapeutiques pour traiter les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, de nombreux efforts sont placés dans le développement de stratégies ayant pour but de prévenir et/ou de ralentir la progression de cette maladie.

#### 1.1.4.1 Les plaques séniles

#### 1.1.4.1.1 Définition des plaques séniles

Les plaques séniles sont essentiellement formées du peptide A $\beta$ , constitué de 39 à 43 acides aminés, qui provient du clivage de la protéine APP (*Amyloïd Precursor Protein*) par différentes sécrétases. Elles sont constituées d'un dépôt sphérique d'A $\beta$ , d'un diamètre de 5 à 100  $\mu$ M qui résulte de l'assemblage compact de feuillets  $\beta$ -plissés provenant de protofibrilles enroulées les uns aux autres [33, 34]. Le processus permettant de convertir l'amyloïde de sa forme soluble en fibrille d'amyloïde est réalisé par l'intermédiaire d'un mécanisme de nucléation nécessitant une phase de transition structurale de l'A $\beta$  [35]. Les filaments d'amyloïde sont situés dans les domaines extracellulaires et ont un diamètre compris entre 6-10 nm. Les plaques séniles peuvent être marquées par des colorants tels que le Rouge Congo et la thioflavine S [33, 36], ce qui permet de facilement les localiser. Elles sont très abondantes au niveau du cortex cérébral et sont plus précisément localisées au niveau de l'isocortex, de l'allo-cortex et du néocortex II et III (incluant le cortex entorhinal). Elles sont également présentes dans l'hippocampe, le cervelet et le striatum [37, 38]. Dans le cerveau, le peptide A $\beta$  s'accumule également dans la paroi des

artérioles et des capillaires causant ainsi une angiopathie amyloïde [39]. Il a été également montré que l'A $\beta$ , sous forme soluble, peut se retrouver dans le liquide céphalorachidien, dans le plasma et même dans des cellules en culture de cerveau humain [40]. Il est intéressant de noter que les plaques séniles activent les cellules microgliales et les astrocytes indiquant la présence d'une réaction inflammatoire dans le cerveau [41-43].

#### 1.1.4.1.2 Formation du peptide A8

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire du système nerveux central, d'environ 700 acides aminés. Elle est constituée d'un large domaine extracellulaire, d'une partie transmembranaire unique et d'une région cytoplasmique [44]. Même si son rôle exact n'est pas clairement identifié, il est établi qu'elle est impliquée dans la synaptogenèse, la plasticité neuronale [45], la transmission synaptique [46], le transport axonal, la mobilité cellulaire et la signalisation intracellulaire [47, 48]. L'APP est une protéine impliquée dans la maladie d'Alzheimer, son clivage par différentes protéases/sécrétases, génère des fragments aussi bien protecteurs que toxiques [49]. Comme nous l'avons mentionné antérieurement, les plaques séniles sont principalement composées de fibrilles d'A $\beta$  agrégées qui résultent de la protéolyse enzymatique de l'APP qui s'effectue par deux voies, soit la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique (Figure 2) [50].



#### Figure 2 Formation de l'amyloïde-β à partir du clivage de l'APP

L'APP est clivée par les sécrétases et va ensuite suivre deux voies : la voie non-amyloïdogénique (non toxique) et la voie amyloïdogénique (toxique). Pour la voie non-amyloïdogénique, l'APP est clivée par la  $\alpha$ -sécrétase et génère un fragment soluble (sAPP $\alpha$ ) et un fragment C-terminal membranaire C83. Ce fragment va ensuite être clivé par la  $\gamma$ -sécrétase pour former un fragment P3 et un domaine intracellulaire APP (AICD). Pour la voie amyloïdogénique, l'APP est clivée par la  $\beta$ -sécrétase et produit un fragment sAPP- $\beta$  et un fragment C-terminal membranaire C99. Ce fragment va ensuite être clivé par la  $\gamma$ -sécrétase et former les fragments A $\beta_{1.42}$  (60 %) et A $\beta_{1.40}$  (40 %) (modifié d'après Sahni, Doggui et Ramassamy, *Jounal of controlled released*, 2011).

Dans la voie non-amyloïdogénique, l'APP est clivée par l'a-sécrétase, protéine appartenant à la famille ADAM (*Disintegrin And Metalloprotease A*) [44]. Ces protéines interviennent dans l'adhésion, la migration cellulaire et le clivage protéolytique de cytokines et de facteurs de croissance. D'après la littérature, trois candidates ont été proposées comme  $\alpha$ -sécrétase : ADAM-9, ADAM-10 et ADAM-17 ou TACE [51, 52]. Le clivage de l'APP induit par ces  $\alpha$ -sécrétases forme un fragment extracellulaire soluble (sAPP  $\alpha$ ) et un court fragment membranaire COOH-terminal ( $\alpha$ -CTF ou C83) [53]. C83 va ensuite être clivé par la  $\gamma$ -sécrétase pour générer un fragment soluble de 3-kDa (P3) [54] et un fragment AICD (*APP Intracellular Domain*) dans le cytoplasme. La  $\gamma$ -sécrétase, ne coupe que les liaisons peptidiques situées à l'intérieur de la bicouche lipidique [55, 56]. Cette protéine est un complexe multimérique composé de quatre protéines : la préséniline (PS1 et PS2), la niscarine, l'Aph1 (*Anterior pharynx defective 1*) et la Pen-2 (*Presenilin enhancer-2*) [57-60]. Le rôle de chacune des sous-unités au sein du complexe est à ce jour mal connu. Cependant, il a été prouvé que l'activité catalytique proviendrait de PS1 [61]. Cette voie n'aboutit pas à la formation du peptide A $\beta$  elle est par conséquent non toxique.

Dans la voie amyloïdogénique, l'APP est clivée par la  $\beta$ -sécrétase ou BACE 1. BACE 1 est une protéine membranaire de type 1 possédant un large domaine extracellulaire comprenant deux résidus asparagiques (Asp-2 ou memapsin-2) impliqués dans l'activité  $\beta$ -sécrétase [62]. Comme son activité nécessite un pH acide, elle est particulièrement active dans les endosomes, ce qui suggère que le clivage de l'APP se ferait lors de son internalisation [63]. Ce clivage va donner un fragment soluble extracellulaire sAPP  $\beta$  et un fragment C-terminal C99 qui reste ancré à la membrane. De nombreuses études ont montré chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, un lien entre l'augmentation de l'expression de BACE 1 et le stress cellulaire induit par différents phénomènes tels que l'ischémie, l'hypoxie et le stress oxydatif [64-66]. Le fragment C99 va ensuite être clivé par la  $\gamma$ -sécrétase pour donner finalement le fragment A $\beta_{1.40}$ soluble ou le fragment A $\beta_{1.42}$  insoluble, présent dans la maladie d'Alzheimer ainsi qu'un fragment AICD libéré dans le cytoplasme qui permettrait la transcription de différentes protéines, dont BACE 1 [67-70]. Les clivages réalisés par les  $\beta$  et  $\gamma$  sécrétases aboutissent à la formation d'A $\beta$ ; cette voie est donc toxique.

#### 1.1.4.2 Les dégénérescences fibrillaires

#### 1.1.4.2.1 Définition des dégénérescences neurofibrillaires

Dans la maladie d'Alzheimer, tous les neurones ne sont pas touchés par la dégénérescence. Il semblerait, au contraire, qu'un seul type de neurone serait touché, soit les neurones pyramidaux [71]. Les dégénérescences neurofibrillaires correspondent à l'accumulation intraneuronale de fibrilles formées par des filaments appariés en hélices PHF (*Paired Helical Filament*). Ces filaments ont un diamètre de 20 nm et un pas d'hélice de 80 nm. Ils s'accumulent dans les corps cellulaires des neurones ainsi que dans leurs prolongements neuritiques. Ils sont constitués de l'assemblage de la protéine Tau (*Tubule-Associated Unit*) anormalement phosphorylée. Ces filaments sont d'excellents marqueurs ultrastructuraux de la dégénérescence

neuronale dans la maladie d'Alzheimer. Les dégénérescences neurofibrillaires peuvent être identifiées par immunohistochimie de la protéine Tau. Les dégénérescences neurofibrillaires s'étendent de manière séquentielle dans le cerveau. En effet, les premières lésions commencent au niveau de la région hippocampique (cortex transenthorinal, entorinal, puis hippocampe) et s'étend progressivement vers les régions associatives (aire de Brodman temporale, pariétale et frontale) et dans les cas les plus sévères se propagent vers les aires sensitives (aires motrices et visuelles) [72].

#### 1.1.4.2.2 La protéine Tau

La protéine Tau appartient à la famille des MAPs (*Microtubule-Associated Proteins*) dont le poids moléculaire est compris entre 45kDa et 65kDa [73]. Le gène de la protéine Tau se trouve sur le chromosome 17 à la position 17q2. À partir de l'épissage alternatif de ce même gène, six isoformes sont obtenus (Figure 3) [74].



# Figure 3 Représentation schématique des six isoformes de la protéine Tau exprimées dans le cerveau humain adulte

Les six isoformes diffèrent par les régions représentées en vert, en mauve et en rouge. Les régions communes à toutes les isoformes sont représentées en bleu et en noir les régions s'associant aux microtubules.

La partie N-terminale de ces protéines, appelée domaine de projection, a un rôle encore peu connu. Cependant, il a été montré qu'elle pourrait interagir avec la membrane plasmique de certains organites tels que les mitochondries [73]. En ce qui concerne le domaine C-terminal des protéines Tau, il comporte trois régions répétitives qui correspondent aux domaines de liaison aux microtubules [73]. La protéine Tau joue ainsi un rôle crucial dans l'assemblage et la

stabilisation des microtubules [74, 75]. Ces derniers ont un rôle important dans la croissance des prolongements neuronaux [76, 77], dans le transport le long des axones et dans la plasticité neuronale [78]. La fixation de cette protéine aux microtubules est assurée par des mécanismes de phosphorylation [73]. En effet, la protéine Tau permet de réguler l'assemblage des sous-unités de tubuline en microtubules. Les protéines phosphorylées induisent la dépolymérisation des microtubules, alors que les protéines déphosphorylées les stabilisent [78]. Il existe près de 80 résidus sérines et thréonines sur la protéine Tau et il semblerait que plus d'une vingtaine soient phosphorylées. La phosphorylation de Tau est régulée par la balance entre différentes kinases (GSK-3, CDK-5 et MAPK) [79, 80] et phosphatases (PP1, PP2A et 2B) [81]. Dans la maladie d'Alzheimer, les PHF s'accumulent dans les corps cellulaires des neurones et dans les neurites [74]. Sous cette forme, les protéines Tau ne peuvent plus se fixer aux microtubules, ce qui va bloquer le fonctionnent neuronal et le transport axonal. Il est intéressant de noter que les dégénérescences neurofibrillaires ne sont pas spécifiques à la maladie d'Alzheimer [82]. Ce processus dégénératif est très répandu parmi les pathologies démentielles et neurodégénératives [83]. Ces maladies sont nommées des tauopathies. Les sites de phosphorylation sont très similaires entre ces maladies. Cependant, la distribution des différentes isoformes dans la composition des filaments varie. Ainsi, tout comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique et certains syndromes parkinsoniens, tels que le syndrome de l'île de Guam et le Parkinson post-encéphalitique, sont caractérisés par l'hyperphosphorylation des isoformes de 60, 64 et 68 kDa (et de manière minoritaire de l'isoforme de 72 kDa). Par contre, dans la paralysie supranucléaire progressive et la dégénération corticobasale, l'isoforme de 60 kDa n'apparaît pas phosphorylé [84, 85]. Dans la maladie de Pick, c'est l'isoforme de 64kDa qui est phosphorylée [82].

#### 1.1.4.3 La perte neuronale et synaptique dans la maladie d'Alzheimer

La perte neuronale est un phénomène essentiel dans la maladie d'Alzheimer, même si difficilement quantifiable. Il a été montré que dans les régions corticales, elle est de 20 %, alors qu'elle peut atteindre près de 50 % dans certaines régions associatives [86]. Elle prédomine principalement dans le cortex entorhinal (région CA1 de la corne d'Ammon), où elle atteindrait 90 % des neurones [87]. Les causes de cette mortalité neuronale ne sont pas totalement

élucidées, malgré de nombreuses hypothèses émises, la principale étant l'implication des processus lésionnels induits par l'apparition des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires (présence d'apoptose) [88].

La seconde perte constatée est la **perte synaptique**, mise en évidence par la diminution de la synaptophysine (protéine de la membrane des vésicules synaptiques), ainsi que d'autres protéines présentes dans l'élément pré-synaptique [89]. Il est cependant difficile de déterminer précisément l'apparition de cette perte. Il a été également montré que la quantité de GAP-34, protéine jouant un rôle dans le maintien synaptique et la régénérescence neuritique, est significativement réduite dans le lobe frontal de sujets atteints de la maladie d'Alzheimer, comparés à des sujets sains [90].

#### 1.1.5 Les différentes hypothèses de l'apparition de la maladie d'Alzheimer

Au cours des 25 dernières années, de nombreuses hypothèses ont proposé un évènement pathologique spécifique lié au développement du déclin cognitif aboutissant à la maladie d'Alzheimer. Les hypothèses causales les plus fréquemment évoquées sont les suivantes :

- l'hypothèse amyloïde (accumulation de protéine bêta-amyloïde);
- l'hypothèse cholinergique (réduction cholinergique);
- l'hypothèse du cycle cellulaire (rentrée dans le cycle de division cellulaire);
- l'hypothèse inflammatoire (inflammation cérébrale);
- l'hypothèse tauiste (présence de dégénérescences neurofibrillaires/protéine Tau);
- l'hypothèse vasculaire (hypoperfusion cérébrale liée à l'avancée en âge, en présence de facteurs de risque vasculaires);
- l'hypothèse du stress oxydatif (accumulation de radicaux libres).

Dans cette thèse, nous détaillerons plus précisément les hypothèses cholinergiques, amyloïdes et celle du stress oxydatif.

#### 1.1.5.1 L'hypothèse cholinergique de la maladie d'Alzheimer

L'étude biochimique systématique de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a débuté à la fin des années 1960 et au début des années 1970. Ces études ont permis de mettre en évidence une corrélation entre le déclin de symptômes cognitifs et non cognitifs et les altérations de la neurotransmission cholinergique [91], conduisant à privilégier l'hypothèse cholinergique de la maladie d'Alzheimer [92].

#### 1.1.5.1.1 La synapse cholinergique

L'acétylcholine est un neuromédiateur, synthétisé à partir de la choline et de l'acétylcoenzyme A [93]. Cette réaction est catalysée par la choline acétyltransférase qui est une enzyme cytoplasmique synthétisée dans le corps cellulaire des neurones cholinergiques et transportée vers la terminaison synaptique par un transport antérograde. L'acétylcholine est ensuite apportée aux vésicules synaptiques à l'aide d'une ATPase. Lorsque la membrane est dépolarisée par l'arrivée d'un potentiel d'action, les canaux Ca<sup>2+</sup> voltages dépendants s'ouvrent. Cela induit une libération importante de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire provoquant ainsi l'exocytose des vésicules synaptiques entraînant la libération de l'acétylcholine dans la fente synaptique. L'acétylcholine se fixe ensuite sur deux types de récepteurs, soit les récepteurs muscariniques, qui sont des récepteurs métabotropiques (récepteurs couplés aux protéines G), et les récepteurs nicotiniques (récepteur ionotropitque). L'acétylcholine libérée dans la fente synaptique est dégradée par une enzyme, l'acétylcholinesterase. Elle hydrolyse l'acétylcholine en choline et en acide acétique, et 50 % de cette choline formée est recaptée par la terminaison synaptique (Figure 4) [92].



Figure 4 Représentation schématique de la synapse cholinergique et de la recapture de l'acétylcholinestérase

(1) Synthèse de l'acétylcholine (Ach) à partir de la choline et de l'acétylcoenzyme A. La synthèse de l'Ach nécessite l'enzyme choline-acétyl-transférase (CAT). (2) L'ACh est stockée dans les vésicules pre-synaptiques. (3) Elle est libérée par l'arrivée du potentiel d'action (PA) au niveau de la terminaison nerveuse induisant ainsi l'ouverture des canaux-voltages dépendants qui provoquent l'ouverture des vésicules dans la fente synaptique permettant la libération de l'ACh. (4) L'Ach est ensuite hydrolysée par l'acétylcholinestérase (AChE) en choline et acétate qui sont rapidement recaptées par le neurone pré-synaptique. (5) Dans la maladie d'Alzheimer l'utilisation d'inhibiteur de l'AChE (donopézil, rivastigmine et galentamine) permettrait d'améliorer la transmission synaptique. (inspirée de Francis, Palmer et Wolcok, Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 1999).

#### 1.1.5.1.2 Le déficit cholinergique et la maladie d'Alzheimer

L'hypothèse cholinergique de la maladie d'Alzheimer est basée sur des études *post mortem* de cerveaux de patients atteints de cette pathologie. En effet, l'étude biochimique de tissus provenant de biopsies de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer indique un déficit sélectif de neurotransmetteurs. Spécifiquement, des marqueurs pré-synaptiques du système cholinergique apparaissent uniformément réduits, ce qui est illustré par une diminution de l'activité de l'acétylcholine transférase et de la synthèse de l'acétylcholine. Ces déficits sont fortement corrélés au niveau d'altérations observées chez ces patients [94-96]. Par ailleurs, des études neurochimiques ont montré que la perte des neurones cholinergiques, au niveau du noyau basal de Meynnert, et la perte de la transmission cholinergique dans le cortex cérébral et dans d'autres aires, contribuent significativement à la détérioration des fonctions cognitives [91]. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de modèles animaux. Par exemple, des études réalisées chez des rats traités à la scopolamine, un antagoniste des récepteurs muscariniques, indiquent une diminution du taux d'acétylcholine dans l'hippocampe avec, en parallèle, un déficit de la mémoire spatiale [97-99]. Or, l'hippocampe reçoit ses afférences cholinergiques via le septum médian (composé majoritairement de neurones cholinergiques et impliqué dans la synthèse de l'acétylcholine transférase) [100]. Ainsi, la lésion au niveau du septum médian induit une diminution de l'activité de l'acétyltransférase et donc une diminution de la synthèse d'acétylcholine aboutissant à la perte de la mémoire [101, 102]. De plus, l'administration de la linopiridine, un agent augmentant le relargage de l'acétylcholinestérase et, par conséquent, induisant une diminution de l'acétylcholine dans la fente synaptique chez les animaux traités, provoque un déficit de la mémoire spatiale [103]. Par ailleurs, il a été montré que l'Aß peut agir sur la transmission cholinergique en bloquant l'absorption de choline et le relargage de l'acétylcholine [104, 105]. Des études ont aussi montré que la diminution de la voie cholinergique provoque la diminution de la kinase Akt, induisant l'augmentation de la kinase GSK-3 qui va phosphoryler la protéine Tau [106, 107].

#### 1.1.5.2 Hypothèse de la cascade amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde place l'agrégation des fibrilles d'Aß comme le phénomène initiateur de la maladie d'Alzheimer, considérant les autres modifications neurodégénératives (e.g. hyperphosphorylation de la protéine Tau, inflammation et stress oxydatif) comme étant des phénomènes secondaires [108, 109].



Figure 5 Hypothèse de la cascade amyloïde de la maladie d'Alzheimer

Cette hypothèse soutient l'idée que l'agrégation du peptide  $A\beta$  serait responsable des évènements en aval tels que la perte neuronale, le dépôt des plaques, la neuro-inflammation l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et finalement les déficits neuronaux et cognitifs (d'après Hardly 2002).

Cette hypothèse se base sur l'observation des plaques séniles dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer qui est caractéristique de cette pathologie. Elle a surtout été renforcée par la découverte de mutations génétiques responsables de la forme familiale autosomale dominante de la maladie d'Alzheimer sur les gènes codant pour l'APP, PS1 ou PS2 [110]. Ainsi, d'après cette hypothèse, l'agrégation anormale d'A $\beta$  entraînerait une série de déséquilibres et de processus neurotoxiques aboutissant à la mort neuronale et à la démence. Récemment, de nombreuses études attestent qu'il n'y pas uniquement les fibrilles d'A $\beta$  qui sont responsables de la toxicité, mais aussi les oligomères de faible poids moléculaire tels que les protofilaments, les monomères et les agrégats sphériques. Bien que les mécanismes d'agrégation et l'apparition de l'A $\beta$  chez l'homme sont encore très mal connus, il est important de souligner que les premiers

oligomères sont les plus toxiques et apparaissent avant la formation des plaques en réponse à leur propre accumulation. En effet, les fibrilles d'A $\beta$  et les oligomères sont responsables de la dégénérescence impliquée dans l'altération des fonctions synaptiques liées au déficit cognitif présent dans la maladie d'Alzheimer [111, 112]. Par ailleurs, les dimères, trimères et tétramères peuvent induire de la toxicité en se liant aux lipides membranaires, en stabilisant la formation des fibrilles intermédiaires et en perturbant la plasticité synaptique [113]. Cependant, depuis ces dernières années, une meilleure connaissance de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer a conduit les chercheurs à revoir le rôle de l'A $\beta$  dans la maladie d'Alzheimer et, par conséquent, l'hypothèse de la cascade amyloïde. En effet, des études ont montré :

- une induction de la diminution des lésions causées par le stress oxydatif à proximité des dépôts amyloïdes [114];
- l'apparition du stress oxydatif semble précéder les dépôts amyloïdes [115-117];
- l'Aβ<sub>1-40</sub> et Aβ<sub>1-42</sub> auraient un effet protecteur sur le stress oxydatif induit par le fer et le cuivre [118].

En se basant sur ces observations, deux écoles de pensées se sont établies en ce qui concerne le rôle de l'A $\beta$  dans la maladie d'Alzheimer : 1) elle initierait les processus de production des espèces réactives de l'oxygène et les dysfonctions mitochondriales et, 2) la production d'A $\beta$  serait une voie de défense contre le stress oxydatif.

#### 1.1.5.3 L'hypothèse du stress oxydatif

Un intérêt considérable est porté sur l'importance des radicaux libres dans la physiopathologie de nombreuses maladies neurodégénératives et principalement dans la maladie d'Alzheimer [119, 120]. Il est important de noter que, en raison de sa forte teneur en lipides, de sa consommation élevée en oxygène et de son faible système de défense antioxydant, le cerveau est particulièrement sensible au stress oxydatif [121-124]. Bien que le cerveau représente seulement 2 % du poids corporel, il consomme environ 25 % de l'oxygène respiré. C'est pourquoi les neurones sont particulièrement vulnérables au stress oxydatif [122]. En effet, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'apparition des plaques séniles et de dégénérescences neurofibrillaires, sont étroitement liées à une cascade d'événements précoces induisant la formation d'A $\beta$  [109]. Cette cascade est la cause de nombreuses dérégulations des

voies de signalisations, des dysfonctions mitochondriales, de la toxicité et des modifications du métabolisme cellulaire. Or, tous ces évènements conduisent à la formation directe ou indirecte de radicaux libres qui induisent la synthèse d'Aβ [125].

#### 1.1.5.3.1 Généralités sur le stress oxydatif

#### Les radicaux libres

La production des radicaux libres, également appelée espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, fait partie du métabolisme cellulaire physiologique chez les organismes aérobies. Les radicaux libres sont des molécules possédant un électron célibataire sur la dernière orbitale électronique. Ces composés sont extrêmement instables et auront tendance à réagir avec d'autres molécules plus stables afin d'apparier leur électron célibataire. La majorité des radicaux libres est produite par la chaîne respiratoire mitochondriale (90 %) [126]. En effet, une grande partie de l'oxygène récupérée par la respiration se transforme en H<sub>2</sub>O par une réduction tétravalente dans la membrane interne mitochondriale [127]. Cette réaction joue un rôle très important dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP en ATP. Elle permet de fournir une importante source d'énergie (36 molécules d'ATP) [127]. Une petite quantité de radicaux libres peut être bénéfique à la cellule en jouant le rôle de messager, régulateur de gènes ou médiateurs de l'activation cellulaire [128]. Cependant, certaines études suggèrent qu'un faible pourcentage (1-5 %) de l'O2 utilisée par la mitochondrie n'est pas complètement réduit et produit des espèces réactives de l'oxygène. Cette petite quantité peut s'amplifier par des mécanismes inflammatoires, d'intoxication aux métaux lourds, d'irradiations, d'ischémies, de défaillances nutritionnelles ou de la carence d'un ou de plusieurs antioxydants d'origine alimentaire [128]. Ce phénomène peut aussi apparaître à la suite d'une anomalie génétique responsable du mauvais codage d'une protéine antioxydante comme la glutathion synthétase (GS) produisant le glutathion (GSH) [128].

Ainsi, les radicaux libres sont produits spontanément et continuellement au sein de notre organisme. Le maintien homéostatique du niveau des espèces réactives à l'oxygène est contrôlé par les défenses antioxydantes de l'organisme de nature enzymatique [129] ou non enzymatique [130].

#### Les systèmes de défense antioxydants

Les **antioxydants enzymatiques** (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, etc.) semblent être la première ligne de défense contre les espèces réactives à l'oxygène (Figure 6) :

- La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la réaction de dismutation de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La SOD existe trois isoformes, dépendantes de sa localisation cellulaire, une forme cytoplasmique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) [130-132].
- La glutathion peroxydase (GPx) agit sur la dismutation de l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Lors de cette réaction, deux molécules de GSH-réduit sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) [130, 132]. À titre d'information, il existe également une GPx associée à la membrane mitochondriale qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) [130, 132].
- La glutathion réductase (GR) permet de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée dans la cellule, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. La GPx et la GR sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries [133].
- La catalase catalyse la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en formant de l'H<sub>2</sub>O et de l'O<sub>2</sub> [130] [132].
  Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et, en plus faible quantité, dans le cytoplasme.

Les antioxydants non-enzymatiques (vitamines, oligoéléments, coenzymes, polyphénols, etc.) ne sont pas synthétisés par l'organisme. Ils proviennent majoritairement de notre alimentation.

#### Stress oxydatif : Définition

À l'état normal, la balance anti/pro-oxydant est en équilibre. Si cet équilibre est perdu, la cellule se trouve alors en situation de **stress oxydatif**. Cette situation devient pathologique dès que le système de protection est submergé par les radicaux libres. Ainsi, le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération des espèces réactives à l'oxygène et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières.

La formation des radicaux libres est décrite par la figure 6. L'O<sub>2</sub> est capable de capter un électron par réduction monovalente et former l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La dismutation de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> par la SOD entraine la formation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas un radical libre, proprement dit, mais il est réactif et possède une forte activité oxydante. De plus, il est capable de traverser les barrières biologiques et peut ainsi se retrouver loin de son lieu de production. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en présence de fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>), va se décomposer, suivant la réaction de Fenton, en un radical hydroxyle (OH<sup>°</sup>). Le monoxyde d'azote (NO) interagit avec les anions superoxydes pour former des anions peroxonitriques (ONOO<sup>-</sup>) et sa dégradation va aboutir à la formation du radical dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub><sup>°</sup>). L'OH<sup>°</sup> et le NO<sub>2</sub><sup>°</sup> sont très instables et très réactifs ce qui leur permet d'interagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides et ADN) [128, 134, 135].



#### Figure 6 Formation et détoxification des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogéne

(1, 2, 3) : La réduction monovalente de l'oxygène (O<sub>2</sub>) résulte en la formation de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) dans la mitochondrie, qui est ensuite convertie en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par la superoxyde-dismutase (SOD). (4, 5, 6): Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est catabolisé soit par la catalase qui aboutit à la formation du H<sub>2</sub>0 et de l' O<sub>2</sub>, soit par la glutathion peroxydase qui permet la peroxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) qui est recyclé pour être réduite en GSH par la glutathion réductase. (7, 8) : Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en présence de fer <sup>2+</sup>, génère le radical hydroxyle (OH<sup>+</sup>) qui va induire l'oxydation des macromolécules. (9, 10, 11) : La combinaison de monoxyde d'azote (NO) et de O<sub>2</sub><sup>--</sup> forme l'anion peroxynitrite (OONO<sup>-</sup>) et sa dégradation séquentielle va aboutir à la formation du radical dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub><sup>+</sup>) (modifié de Chauchan V et chauchan A, 2006, phathophysiology.

Cependant, dans une situation pathologique l'excès de radicaux libres peut entraîner de nombreux dommages tels que la peroxydation lipidique [136, 137], l'oxydation de l'ADN (dont l'ADN mitochondrial) [138], induisant la mutation de nombreuses bases, la rupture du double brin et l'oxydation des protéines causant ainsi la perte de leurs propriétés [139].

Sous l'action des radicaux libres, l'ADN nucléaire va être altéré par différents mécanismes tels que l'oxydation des bases, la formation de sites abasiques, d'adduits intracaténaires et de la rupture des brins, etc. L'oxydation des bases engendre la formation d'un grand nombre de bases modifiées tel que 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimido uracile, 5 hydroxycytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol,
oxazolone [140]. L'oxydation de l'ADN est très fréquente, mais les systèmes de réparation (excision et recombinaison des bases) sont particulièrement efficaces, ce qui permet le maintien de l'ADN [141]. L'ADN mitochondrial est plus sensible au stress oxydatif que l'ADN nucléaire. Cela peut s'expliquer par le fait que l'ADN mitochondrial ne possède pas d'histones, qu'il est localisé proche de la membrane interne, que ses mécanismes de réparations sont faibles et que sa structure circulaire sans introns augmente le risque de mutations [140]. Par ailleurs, l'ADN mitochondrial code pour des sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative. Ainsi, leur mutation pourrait augmenter la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire en induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène. Or, plus la fuite d'électrons est importante, plus le stress oxydatif va augmenter les mutations mitochondriales aggravant ce phénomène [141].

Les **protéines** et les acides aminés sont aussi susceptibles d'être oxydés par les espèces réactives de l'oxygène via des modifications chimiques (Tableau 1-1). En effet, les protéines sont particulièrement sensibles aux attaques radicalaires. Les principales modifications oxydatives sont provoquées par l'introduction de groupes carbonyles (R-CH=O ou R-C=O-R') ou hydroxyles (R-OH), et la formation de pont disulfure ou de méthionine sulfoxide dans la protéine [142]. Les principaux mécanismes de formation des protéines carbonylées [143, 144] sont :

- Le clivage oxydatif de la chaine carbonée polypeptidique de différents acides aminés via une liaison α-aminée (lysine, arginine, proline, tryptophane, etc.) [139].
- La formation d'adduit de Michael entre les résidus histidine, lysine et cystéine avec des produits de la peroxydation lipidique [145, 146].
- Par la réaction de réduction d'un sucre ou d'un produit d'oxydation avec les résidus lysines et arginines (glycation et glycoxydation).

Les modifications apportées sur les protéines aboutiront, dans certains cas, à la perte de leurs propriétés biologiques (enzymes et récepteurs), ce qui pourrait entrainer une plus grande sensibilité aux protéases et aux protéasomes.

Acide aminé	Produits d'oxydation
Cystéine	Disulfide, acide cystique
Méthionine	Méthionine sulfoxide, méthionine sulfone
Tyrosine	Dityrosine, nitrotyrosine, chlorotyrosines, 3,4-Dihydroxyphenylalanine
Tryptophane	Hydroxy- et nitro-tryptophans, kynurenine
Phénylalanine	Hydroxyphenylalanine
Valine, Leucine	Hydroperoxides
Histidine	2-Oxohistidine, asparagine, aspartate
Proline	Hydroxyproline, pyrrolidone, glutamic semi-aldéhyde
Thréonine	Acide 2-Amino-3-cetobutyrique
Arginine	Semialdéhyde glutamique, chloramine
Glutamate	acide oxalique, acide pyruvique
Lysine	Semialdéhyde, chloramine

Tableau 1-1 Les produits d'oxydation des principaux acides aminés (modifié de B. Berlett et Earl R. Stadtman 1997, Journal of Biological Chemistry)

Les dommages causés par **l'oxydation des lipides** diffèrent fondamentalement des autres radicaux libres. En effet, la peroxydation lipidique peut endommager les membranes cellulaires en perturbant la structure membranaire causant ainsi des changements de fluidité et de perméabilité membranaire, des altérations dans le transport des ions et l'inhibition de procédé métabolique. L'oxydation des lipides génère également des sous-produits hautement réactifs tels que les isoprostanes, les neuroprostanes, les malondialdehydes (MDA), le 4-hydroxy-2-trans-nonenal (4-HNE) et l'acroléine [147].

Les **isoprostanes** dérivent *in situ* de la peroxydation de la forme estérifiée de l'acide arachidonique formant les F2-isoprostanes [148]. Les acides gras polyinsaturés et l'acide docosahexnoique peuvent être également oxydés générant les F3-isoprostanes et les F4-isoprostanes. Ces derniers sont appelés neuroprostanes du fait de la présence d'un taux élevé de leur précurseur dans le cerveau [149, 150]. Une fois produits, les isoprostanes sont hydrolysés par des phospholipases et relargués sous forme de phospholipides. Par ailleurs, certains isoprostanes sont des composés électrophiles hautement réactifs et vont former des adduits de Michael avec les thiols (résidus cystéines et GSH) présents dans la cellule [151].

Le 4-HNE résulte de la peroxydation lipidique de l'acide linoléique et de l'acide arachidonique. Il est connu pour être fortement réactif et agit comme un médiateur de stress oxydatif [152]. Il est cependant difficile de le quantifier *in vivo*, car il réagit très rapidement avec le GSH, avec différentes protéines ou avec des acides nucléiques. Il réagit également avec les résidus lysines, histidines et cystéines aboutissant à la formation des adduits de Michael et de base de Schiff [147].

Tel que démontré précédemment, la peroxydation lipidique génère des composés carbonylés,  $\alpha,\beta$ -insaturés hautement réactifs incluant l'acroléine. Plus précisément, l'acroléine de formule moléculaire CH<sub>2</sub>=CH-CHO est un aldéhyde,  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturé possédant un groupement aldéhyde et une double liaison carbone-carbone. L'acroléine est un composé fortement électrophile qui réagit avec les groupements nucléophiles [152]. En effet, de nombreuses études suggèrent que l'acroléine interagit avec les résidus lysine, cystéine et histidine [152, 153]. Il est intéressant de noter que l'acroléine réagit plus rapidement avec les groupements thiols qu'avec les groupements amines. Par conséquent, l'acroléine réduit le taux de GSH par la formation de GSH-acroléine [153]. Ce composé est particulièrement intéressant, car parmi tous les aldéhydes  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturés, l'acroléine est le plus réactif avec le GSH. Par exemple, il réagit avec le GSH entre 100 à 150 fois plus rapidement que le 4-HNE [153]. La constante de dissociation des adduits formés entre les thiols et l'acroléine est 10 à 1 000 fois supérieures à celles formées avec des aldéhydes confirmant effectivement que les adduits thiol-acroléine sont plus stables que ceux formés avec d'autres aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturées [147, 152-154]. Des études comparatives ont montré que l'acroléine est plus toxique que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'OH<sup>•</sup>. De plus, elle agirait directement sur la mitochondrie en ciblant spécifiquement la lactate déshydrogénase et le complexe I mitochondrial

[155, 156]. Des études récentes, réalisées dans notre laboratoire, ont permis de montrer que l'acroléine induit la diminution du GSH, la génération des espèces réactives de l'oxygène, l'oxydation des protéines et modifie la voie de signalisation sensible au potentiel-redox impliquée dans le stress oxydatif [157].

#### 1.1.5.3.2 Lien entre l'AB et le stress oxydatif

Un nombre considérable d'études indique que l'A $\beta$  provoque des dommages oxydatifs induisant la mort neuronale et provoquant ainsi des déficits de mémoire et de cognition tels qu'observés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer [135]. La toxicité induite par l'Aß à travers différents mécanismes [158]. Par exemple, il a été récemment démontré que les formes monomériques A<sub>β1-40</sub> et A<sub>β1-42</sub> joueraient un rôle neuroprotecteur en chélatant les espèces réactives de l'oxygène induites par les ions métalliques. En effet, l'Aß possède une forte affinité pour le Cu<sup>2+</sup> et le Zn <sup>2+</sup>. Cependant, l'amyloïde sous forme agrégée ou oligomérique devient toxique et perd son activité antioxydante, contribuant à la génération d'espèces réactives de l'oxygène tel que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [159]. Ainsi, l'hypothèse récemment émise serait que l'augmentation de la chélation des métaux par l' Aß augmenterait la concentration d'Aß au niveau des plaques séniles et l'effet protecteur deviendrait par conséquent toxique [160, 161]. De plus, le complexe  $A\beta$ -Cu<sup>2+</sup> est capable d'oxyder le cholestérol formant des oxystérols neurotoxiques qui exercent un effet toxique à de très faibles concentrations (de l'ordre du nanomolaire), via la génération des espèces réactives à l'oxygène, notamment l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [162]. Inversement, le traitement des cellules de neuroblastomes humains (SH-SY5Y) avec induit l'augmentation de l'Aß [163]. Les fibrilles d'Aß sont également capables de générer du monoxyde d'azote qui, directement ou indirectement, peut provoquer un dysfonctionnement mitochondrial induisant la mort neuronale chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer [164, 165]. Comme mentionné précédemment, le stress oxydatif est impliqué dans l'oxydation des macromolécules cellulaires induisant l'oxydation de l'ADN, des protéines et des lipides. Or, des études ont montré que cette oxydation serait liée à l'action de l'Aß. En effet, l'exposition des cellules PC12 (cellules issues d'un phéochromocytome de rat) à de l'Aß induit des dommages de l'ADN mitochondrial [166]. De plus, il a été montré que l'injection du peptide A\beta1-42 au niveau du noyau basal de Meynert d'un cerveau de rat provoque l'augmentation du taux de

protéines carbonylées. Ces résultats ont été confirmés par des études protéomiques qui ont permis de déterminer la localisation régionale de l'oxydation protéique. Certaines protéines oxydées ont été localisées au niveau du cortex telles que la glutamine synthétase, la tubuline  $\beta$  et la chaperonine 60 (HSP60) et d'autres protéines ont été localisées au niveau de l'hippocampe telles que la  $\beta$ -synucléine, la pyruvate déshydrogénase, et la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase [167]. Ces résultats suggèrent qu'une injection ciblée dans le cerveau peut avoir des répercussions propagées dans différentes régions de celui-ci. L'A $\beta_{1.42}$  augmente également la peroxydation lipidique via la production du 4-HNE et de l'acroléine [147, 168, 169]. En effet, il a été suggéré que le traitement des cellules de tératocarcinome humain (NT2) avec du 4-HNE induit également une augmentation du niveau d'A $\beta$  [170].

#### 1.1.5.3.3 Protéine Tau et le stress oxydatif

Tel que cité dans le paragraphe 1.1.4.2.2, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer est la conséquence de l'augmentation de l'activité de protéines kinases [171, 172] et/ou la diminution de l'activité de protéines phosphatases [173]. Par ailleurs, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que le stress oxydatif contribue à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et à la formation des lésions neurofibrilaires. En effet, le traitement de culture primaire de neurones par une combinaison de cuprizone (un chélateur de cuivre) et de Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induit un stress oxydatif, qui a provoqué l'augmentation de façon anormale la phosphorylation de la protéine Tau [174]. Dans une autre étude, il a été rapporté que le traitement de cellules de neuroblastomes humains (5H-SY5Y) et des neurones corticaux primaires issus d'embryons de souris par l'acroléine, augmente considérablement l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Cette phosphorylation a lieu au niveau du site reconnu par PHF-1, qui est le site de phosphorylation de la kinase GSK3 [175]. Plus récemment, il a été suggéré que l'induction d'un stress oxydatif chronique aux cellules issues de neuroblastomes humains (M17) via l'inhibition de la GSH par la BSO augmente significativement l'hyperphosphorylation de la protéine Tau au site PHF-1 (ser 396/404) [176].

Ces études sont en accord avec d'autres réalisées sur des modèles amicaux transgéniques. Telle que l'étude du modèle de la drosophile mutante pour la thioredixine réductase induisant ainsi une diminution de la sod2 mitochondriale provoquant par conséquent la toxicité liée à la protéine Tau [177]. Ces résultats ont été confirmés par le modèle de souris transgéniques (Tg2576/sod2<sup>-</sup>) surexprimant la forme mutante de l'APP humaine et la mutation hétérozygote de la Sod2. Les auteurs ont montré que ces souris présentent une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau sur la serine-396 [178].

#### 1.1.5.3.4 L'implication du stress oxydatif dans la maladie d'Alzheimer

De nombreuses études supportent le rôle du stress oxydatif dans la physiopathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Particulièrement, des études réalisées sur des cerveaux *post mortem* de patients atteints de la maladie d'Alzheimer montrent une augmentation de l'oxydation de l'ADN [124, 179], des protéines [139, 144] et des lipides [121]. Parmi les différentes modifications oxydatives, la peroxydation lipidique serait l'un des inducteurs de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. En effet, l'augmentation du niveau de peroxydation lipidique chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer a été déterminée par l'augmentation de la concentration : du F4-isoprostanes dans l'hippocampe et le cortex frontal [180], du F2-isoprostanes dans le liquide céphalorachidien [181], du 4-HNE [182] dans l'hippocampe, dans l'amygdale, dans le gyrus temporal médian et dans le cervelet [121].

Plus récemment, des études réalisées sur des tissus *post mortem* de cerveaux de patients souffrant de troubles cognitifs légers (MCI, *Mild Cognitive Impairment*), correspondant au stade précoce de la maladie d'Alzheimer présentent un profil similaire de dommages causés par le stress oxydatif. Cependant, très peu d'études ont réussi à quantifier le taux des marqueurs de stress oxydatif [183]. À ce jour, une seule étude a quantifié l'ADN oxydé dans le cerveau de tissus *post mortem* de patients MCI. Cette étude suggère que les taux de 8-hydroxyguanosine 5-hydroxycytosine et 8-hydroxyadenine sont significativement plus élevés dans l'ADN nucléaire des neurones issus du lobe frontal, pariétal et temporal des patients MCI que celui des sujets contrôles [184].

Le nombre d'études ciblant les protéines oxydées chez les patients MCI est également très limité. Il a été cependant montré que la concentration des protéines carbonylées dans le gyrus temporal moyen des patients MCI est supérieure au sujet contrôle, suggérant ainsi une augmentation du stress oxydatif [185]. De plus, une étude protéomique a identifié différentes protéines oxydées dans l'hippocampe de patients MCI tels que α-enolase, glutamine synthétase et la pyruvate kinase [186]. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de conclure à la possible contribution de l'oxydation protéique dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Les protéines carbonylées ont été principalement détectées au niveau des neurones en dégénérescence neurofibrillaire [187]. Certaines de ces protéines oxydées sont impliquées directement ou indirectement dans la production énergétique, dans le système antioxydant, dans le système d'ubiquitination, dans les protéines de choc thermique et dans le système synaptique. L'oxydation de ces protéines pourrait donc compromettre leur intégrité fonctionnelle [188, 189]. En effet, des études *in vitro* réalisées dans le laboratoire démontrent que le traitement des cellules de neuroblastomes humains, les SK-N-SH par de l'acroléine induit l'augmentation des protéines carbonylées et du niveau du 4-HNE ainsi que l'activation de nombreuses voies de signalisation sensibles au potentiel redox [121, 157, 190].

Contrairement à l'ADN et aux protéines oxydées, de nombreuses études ont montré une augmentation de la peroxydation lipidique dans le cerveau de patients MCI. Certaines de ces études ont été détaillées dans la revue de Singh et ses collaborateurs [121]. Brièvement, il a été observé chez les patients MCI une augmentation de la concentration de F2-isoprostane dans les urines, le plasma et le liquide céphalorachidien [191-193], de F4-isoprostanes au niveau du lobe frontal, pariétal et occipital [194]. Les résultats concernant l'acroléine sont plus nuancés. En effet, il a été montré que la concentration d'acroléine est supérieure dans l'hippocampe et le cervelet des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, contrairement aux patients MCI. Par ailleurs, aucune différence du taux d'acroléine n'a été observée entre les patients MCI et les contrôles dans ces régions spécifiquement. Cependant, cette même étude démontre que la concentration d'acroléine est significativement plus élevée au niveau du gyrus temporal moyen chez les patients MCI que chez les contrôles [195]. Une étude comparative plus récente a montré que la concentration d'acroléine est supérieure dans l'hippocampe de patients MCI comparée à celle des contrôles [196-198]. Ces résultats suggèrent donc que la peroxydation lipidique apparaît précocement dans le développement de la maladie et au niveau de différentes régions du cerveau.

Ces résultats ont été récemment confirmés par des études *in vitro* et *in vivo* suggérant l'implication de l'acroléine dans la maladie d'Alzheimer. Nous avons récemment démontré dans le laboratoire que l'acroléine exerce un effet toxique sur des cultures primaires d'astrocyte de rats en agissant sur le GSH et sur la gamma-glutamylcystéine synthétase. De plus, l'acroléine active différentes voies de signalisation redox qui seront détaillées dans le chapitre 1.1.6 tel que Nrf2, Nfk-B et Sirt-1 [190]. L'acroléine induit également la mortalité des neurones d'hippocampiques immortalisés (HT22) de façon temps et dose – dépendants [199]. Les auteurs ont également démontré que l'acroléine augmente le niveau de certaines protéines associées à la maladie d'Alzheimer tel que l'APP, BACE-1 et ADAM-10. De plus, l'administration intragastrique de 2,5 mg/kg/jour d'acroléine pendant 8 jours à des rats cause une diminution de leur apprentissage mesurée au test de la piscine de Morris ainsi qu'une atrophie des neurones hippocampiques [199]. Ces résultats sont particulièrement intéressants, car jusqu'à présent très peu d'études sur des modèles animaux ont montré l'effet de l'administration orale d'acroléine sur le cerveau du fait du puissant caractère létal [200] ou d'autres complications qu'engendre cette molécule [201-203].

Au cours des 20 dernières années, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la maladie d'Alzheimer, de nombreux modèles de souris transgéniques ont été développés [119]. Ces souris présentent les principaux marqueurs biologiques et cognitifs de la maladie d'Alzheimer tels que les plaques séniles et/ou les dégénérescences neurofibrillaires. Le tableau 1-2 récapitule les principaux modèles animaux utilisés dans la maladie d'Alzheimer et cible principalement les dommages causés par le stress oxydatif. Il est particulièrement intéressant de noter que, chez certains modèles animaux, le stress oxydatif apparaît avant le dépôt des plaques séniles, suggérant un rôle précoce du stress oxydatif dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, et qu'il pourrait être impliqué dans la synthèse et l'agrégation de l'A $\beta$  [116, 119, 204-207].

Ainsi, l'étude de cerveaux de patients MCI et de modèles animaux a permis de confirmer que le stress oxydatif apparaît de façon précoce dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Il représente donc une cible thérapeutique potentielle afin de ralentir l'apparition et la progression de cette pathologie

## Tableau 1-2 Résumé de marqueurs de stress oxydatifs présents chez certains modèles animaux transgéniques de la maladie d'Alzheimer

Ce tableau décrit le lien entre l'âge et l'apparition des plaques d'Aβ, les déficits cognitifs et l'apparition des dégénérescences neurofibrillaires. (SOD= Superoxyde dismutase; GPX=glutathion peroxidase; GR= glutathion réductase) (modifié de Belkacemi et Ramassamy 2012, *Free Radical Biology and Medicine*).

Souris transgéniques	Mutations	Plaques séniles (Aβ)	DNFs (Tau)	Déficits cognitifs	Dysfonctions mitochondriales	Peroxydations lipidiques	Protéines oxydées	Activité de la SOD	Activité de la GX et GR	Ratio GSH/GSSG
Tg2576	APP Suédoise (Swe) K670N/M671L	11-13 mois [208]	Absentes [208]	9-10 mois [208]		≥ 8 mois [115]	≥ 3mois [209]	≥ 3mois [209]	<ul> <li></li></ul>	-
PS 1M 146L	PS1 M156L	Absentes [210]	-	-	19-22 mois [211]	19-22 mois [211]	-	Absente [211]	Absente [211]	Absente [211]
APP/PS 1	APPSwe/ PS1246L	6 mois [212]	- 3		≥ 9 mois [212]	≥1 mois [213]	≥1 mois [213]		<pre> ◆GPX et GR ≥ 3mois [215] </pre>	
3X-TgAD	APP swe/ Tau P301L/ PS1M146V	6 mois [216]	≥ 12 mois [216]	4 mois [217]	≥ 3 mois [218]	3-5 mois [218]	-0.	<b>↑</b> 3-5 mois [218]	<ul> <li>▲GPX</li> <li>GR absence d'effet</li> <li>3-5 mois</li> <li>[218]</li> </ul>	Absente [218]

#### 1.1.6 Les voies de signalisation impliquées dans la maladie d'Alzheimer

Comme nous l'avons vu précédemment, la maladie d'Alzheimer est une maladie multifactorielle qui est difficile à traiter, car de nombreuses voies biochimiques sont altérées de façon séquentielle ou en parallèle. Ainsi, pour trouver un traitement efficace contre cette pathologie, il est important de bien comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents. De nombreuses études ont montré que les principales voies de signalisation impliquées dans la maladie d'Alzheimer sont la voie antioxydante sensible aux potentiels redox (Keap1/1Nrf2) [219], les voies jouant un rôle dans l'inflammation (NF $\kappa$ -B) [220, 221] et les voies impliquées dans la survie cellulaire (Sirt-1 et Akt/GSK-3) [222, 223].

#### 1.1.6.1 La voie redox antioxydante Keap1/Nrf2 dans la maladie d'Alzheimer

#### 1.1.6.1.1 Interaction Keap1/Nrf2

Le moyen que possède la cellule pour répondre à un stress oxydatif est de développer un système de défense antioxydant endogène afin de maintenir son homéostasie redox et se protéger contre les dommages oxydatifs. De nombreuses études suggèrent un rôle important du facteur de transcription Nrf2 (ou *Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor 2)* [224, 225]. Nrf2 est un membre de la sous-famille des facteurs de transcription *cap'n'collar* de type *zipper* à leucines basiques. Son expression est ubiquitaire. Dans des conditions basales, il est séquestré dans le cytoplasme par la protéine Keap1 (*ou Kelch-like ECH-associated protein 1*). Celle-ci joue un rôle central dans la régulation de la réponse Nrf2. Keap1 va ensuite le cibler vers le protréasome où Nrf2 sera dégradé via des interactions avec l'ubiquitine ligase [226]. Ainsi, Keap1 (riche en résidus cystéines), joue le rôle d'un véritable censeur de l'état redox des cellules.

Dans une situation de stress oxydatif, les résidus cystéines présents sur Keap1 vont réagir avec les espèces réactives de l'oxygène ou avec des molécules dites inductrices (électrophiles) du facteur de transcription Nrf2 présentes dans la cellule modulant la conformation et, par conséquent, les liaisons avec Nrf2. Ainsi, l'oxydation des résidus cystéines libère Nrf2 et bloque son recrutement par le complexe d'ubiquitination associé à Keap1, permettant sa translocation vers le noyau [227]. Une

fois dans le noyau, Nrf2 interagit avec des facteurs de transcription de type *zipper* à leucines basiques (Maf et Jun). Le complexe Maf/Nrf2 se lie à une séquence spécifique de type AleRE (ou *Antioxidative Responsive Element*), située généralement en amont de la séquence codante des gènes, dans la région régulatrice. Les gènes cibles de Nrf2-ARE sont nombreux. Les deux principales catégories sont : 1) les enzymes de la balance redox intracellulaire qui ont pour but de maintenir le niveau intracellulaire de glutathion et de réduire le niveau d'espèces réactives de l'oxygène (Glutathion Peroxydase (GPX), la Thioredoxine (TRX), la Peroxiredoxine (PRX), la Heme Oxygenase-1 (HO-1), la gamma-glutamilcystéine synthétase ( $\gamma$ -GSC) et 2) les enzymes de détoxification de phase 2 qui catalysent les réactions de conjugaison permettant d'augmenter la solubilité des substances toxiques et donc faciliter leur élimination rénale (le Glutathion S-Transferase (GST), la NAD(P)H Quinone Oxidoreductase-1 (NQO1), la UDP-Glucuronosyl Transferase (UGT)) [225]. Nrf2 est également capable d'induire sa propre synthèse [225].



Figure 7 La voie de signalisation Keap1/Nrf2 activée par un stress oxydatif ou un composé électrophile.

Dans des conditions normales, Nrf2 est maintenu par l'ubiquitine ligase, Keap1 dans le cytoplasme, qui est responsable de l'ubiquitination de Nrf2. Les inducteurs de Nrf2 (stress oxydatif ou composés électrophiles) inhibent l'activité de keap1 via la modification covalente ou l'oxydation de certains résidus cystéines très réactifs induisant la déstabilisation des interactions entre Keap1 et Nrf2 et induisant l'ubiquitination de Keap1. Le facteur de transcription Nrf2 pénètre ensuite dans le noyau ou il va activer la synthèse de protéines et d'enzymes antioxydantes.

#### 1.1.6.1.2 L'implication du facteur de transcription Nrf2 dans la maladie d'Alzheimer

L'activité transcriptionnelle de Nrf2 est activée dans des situations de stress oxydatif. Donc, dans la maladie d'Alzheimer, les résultats attendus sont une augmentation de l'activité de Nrf2 dans le noyau des neurones. Or, l'implication de la voie de signalisation Nrf2/ARE dans la pathogenèse et la progression de la maladie d'Alzheimer est supportée par le fait que le taux de Nrf2 est considérablement augmenté dans le cytoplasme et réduit dans le noyau des neurones et des astrocytes de l'hippocampe des patients atteints de la maladie d'Alzheimer [219]. Ces résultats

aberrants peuvent être expliqués par : 1) les neurones de cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ne répondent pas correctement au stress oxydatif; 2) l'activité de Nrf2 pourrait être bloquée par certains mécanismes à déterminer; 3) une diminution générale de la synthèse de la protéine Nrf2, etc. Cependant, l'augmentation de l'expression de Nrf2 dans le cytoplasme élimine l'hypothèse d'un problème de synthèse de la protéine. Des études réalisées chez des animaux transgéniques exprimant la forme mutée de l'APP/PS1, ont montré que la voie Nrf2-ARE est réduite en parallèle avec l'augmentation des dépôts de l'Aß [228]. Il a également été montré que la surexpression de la protéine Nrf2 par l'administration d'un adénovirus transfecté avec Nrf2 ou par l'utilisation du tert-butylhydroquinone (un polyphénol) à des animaux transgéniques est associée à une diminution du stress oxydatif [228]. De plus, l'injection intrahippocampique d'un vecteur lentiviral surexprimant Nrf2 induit une amélioration de l'apprentissage spatial des souris transgéniques APP/PS1 âgées [229]. En accord avec ces résultats, dans le laboratoire, nous avons récemment montré que l'acroléine induit l'activation de Nrf2 [157] par les cellules SK-N-SH et que cette activation est réduite par l'administration d'un antioxydant tel que le curcumin [230]. Compte tenu de la divergence des résultats, des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'inactivation de Nrf2.

#### 1.1.6.2 La voie Sirt I dans la maladie d'Alzheimer

Sirtuine 1 (Sirt 1) est l'un des sept homologues de la famille Sirtuine. Cette enzyme est une déacétylase, impliquée dans de nombreux mécanismes [223] tels que : la régulation des protéines et des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif [231, 232], l'inflammation (NF $\kappa$ -B) [233], l'apoptose [234] et la régulation des gènes de transcription [235]. De plus, il a été montré que Sirt 1 est un régulateur de la genèse mitochondriale et qu'elle est également impliquée dans la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire [236]. L'ensemble de ces données suggère que la voie de signalisation Sirt 1 joue un rôle important dans la survie cellulaire.

Des études récentes ont particulièrement montré un lien entre la voie Sirt 1 et la maladie d'Alzheimer. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que

l'hyperactivation de Sirt 1 permet de réduire les symptômes observés dans la maladie d'Alzheimer. La surexpression in vitro de Sirt 1 induit par le resvératrol ou d'autres polyphénols est liée à une diminution de la forme oligomérique de l'Aß et à une diminution du stress oxydatif [237, 238]. La surexpression de Sirt 1 permet également de protéger les cellules microgliales et les astrocytes contre la toxicité induite par l'Aß en déacetylant la sous unité ReIA/P65 sur la lysine 31, et donc d'inactiver la voie NFK-B [239]. Des données de la littérature ont montré que des souris transgéniques surexprimant l'APP et Sirt 1 (animaux doubles transgéniques APPswe/PSENdE9 croisés avec des animaux transgéniques Sirt 1) présentaient une diminution significative de la formation d'Aß toxique [240]. De plus, il a été démontré que l'effet anti-amyloïdogénique de Sirt 1 est médié par la régulation positive de la transcription et de l'expression de l' $\alpha$ -sécrétase. Par ailleurs, Sirt 1 active le récepteur de l'acide rétinoïque- $\beta$  (RAR- $\beta$ ) en le déacétylant [240]. RAR-β stimule la transcription du gène d'ADAM-10 (qui code l'α-sécrétase) en se liant à son promoteur [241]. Il est connu qu'ADAM-10 joue un rôle dans l'initiation de la voie de signalisation Notch via le clivage du récepteur membranaire de Notch qui va ensuite permettre la transcription de gènes impliqués dans la neurogenèse [242, 243]. Il a été également montré que le taux d'acétylation de la protéine Tau était très élevé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, bloquant ainsi la dégradation de la protéine Tau phosphorylée. Or, le taux d'acétylation de la protéine Tau est plus faible chez les souris transgéniques surexprimant Tau. Ainsi, Sirt 1 via la modulation de l'acétylation de Tau pourrait être une stratégie thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer [244]. En conclusion, l'effet protecteur de Sirt 1 dans ce modèle pourrait provenir à la fois de l'activation de la voie Notch, de l'activation de la voie non-amyloïdogénique et de la déacétylation de la protéine Tau [245].

#### 1.1.6.3 La voie du facteur de transcription NFκ-B dans la maladie d'Alzheimer

NF $\kappa$ -B est un facteur de transcription impliqué dans de nombreux mécanismes biologiques tels que la régulation de cytokines pro-inflammatoires [246] et dans la transcription de gènes impliqués dans des maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer. Il est localisé dans le cytoplasme sous forme inactive. Il est formé de trois sous-unités : un complexe dimérique (facteur de transcription) et une sous-unité inhibitrice I $\kappa$ -B. Dans les neurones, le complexe NF $\kappa$ -B le plus commun est constitué des sous-unités P65, P50 et I $\kappa$ -B $\alpha$  [247-250]. Les mécanismes d'activation du complexe NF $\kappa$ -B impliquent la phosphorylation de la sous-unité inhibitrice I $\kappa$ -B par le complexe kinase I $\kappa$ -B (IKK) [251]. Cette phosphorylation va cibler I $\kappa$ -B vers l'ubiquitination et par conséquent induire sa dégradation par le protéasome. Le complexe dimérique NF $\kappa$ -B (actif) est transloqué dans le noyau et va se lier au promoteur des gènes cibles (SOD et GSH).

L'étude post mortem de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer montre une augmentation de l'expression de NFK-B dans certaines régions du cerveau telles que dans la formation hippocampique, le cortex enthorinale et le gyrus denté [252]. NFk-B est également impliqué dans la régulation du développement, de la plasticité synaptique et dans les mécanismes physiologiques ou pathologiques de survie cellulaire [253]. Il a été également montré que le stress oxydatif peut altérer les fonctions de NFκ-B. En effet, de nombreuses études ont rapporté que l'induction d'un stress oxydatif par le  $H_2O_2$  peut provoquer l'activation de NF- $\kappa B$  et que cette activation serait dépendante du taux de GSH dans la cellule [254]. De plus, le traitement de cellules en culture d'hippocampe par des activateurs de la voie NF $\kappa$ -B (TNF $\alpha$  et C2-céramide) protège de l'apoptose induite par le stress oxydatif et l'AB. Cette protection pourrait être liée à l'augmentation de l'activité de la MnSOD [255]. Il a été montré que l'exposition des neurones cholinergiques en culture avec de l'Aß ou avec le fragment sAPP induit une activation du facteur NFK-B [256]. Dans les cellules gliales, NFK-B est impliqué dans la production de cytokines pro-inflammatoires liées au dépôt du peptide Aß et aux dégénérescences neurofibrillaires [257]. De plus, l'administration d'un antiinflammatoire non-stéroïdien (indométacine) à des animaux Tg2576 réduit significativement le dépôt d'A $\beta$  en bloquant l'activation de NF $\kappa$ -B [258]. Ainsi, l'activation de NFk-B dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer peut être un mécanisme de défense en réponse à la mortalité neuronale induite par l'Aß [259].

#### 1.1.6.4 La voie Akt/GSK-3 dans la maladie d'Alzheimer

La glycogène synthase kinase 3 (GSK-3) régule de multiples processus cellulaires physiologiques et son altération est impliquée dans la pathogenèse de diverses maladies, dont la maladie d'Alzheimer [222, 260]. En effet, GSK-3 en tant que kinase participe à la cascade de nombreux événements allant du métabolisme cellulaire à la transcription génique. Il est maintenant clairement établi que GSK-3 est impliquée dans la réponse au stress oxydatif, l'hyperphosphorylation de la protéine tau, l'augmentation de la production d'A $\beta$ , et la réponse inflammatoire médiée par les cellules microgliales [222].

La GSK-3 est une protéine kinase sérine/thréonine constitutivement active dont deux isoformes ont été identifiées, soit GSK-3 $\alpha$  et GSK-3 $\beta$ . La GSK-3 $\alpha$  (51 kDa) diffère de la GSK-3 $\beta$  (47 kDa) par la présence d'une glycine dans la partie N-terminale de la protéine [261]. Elles sont plus fortement exprimées dans l'hippocampe, dans le cortex frontal et dans les cellules de Purkinje du cervelet [262]. L'activité de la GSK-3 dépend de son état de phosphorylation. Elle est inhibée par la phosphorylation de la Sérine 21 (sur GSK-3 $\alpha$ ) ou de la Sérine 9 (sur GSK-3 $\beta$ ) [263], alors que la phosphorylation de la Tyrosine 216 (sur GSK-3 $\beta$ ) et Tyrosine 279 (sur GSK-3 $\alpha$ ) l'active [264]. Bien que les deux isoformes aient la même régulation, les souris mutantes pour la GSK-3 $\beta$  meurent *in utero* [265], alors que les souris mutantes pour la GSK-3 a sont viables et améliorent la tolérance au glucose [266]. La voie de régulation de la GSK-3 la plus étudiée est celle qui passe par l'activation de Akt (ou protéine kinase B). En effet, l'activation du récepteur à l'insuline conduit à l'activation de la PI3K (ou phosphatidylinositol 3-kinase) qui va phosphoryler Akt et, par conséquent, induire l'inhibition de la protéine GSK-3.

Comme décrit précédemment (chapitre 1.1.5.3.4) le stress oxydatif est considéré comme l'un des acteurs majeurs de la perte neuronale au cours de la maladie d'Alzheimer. De nombreuses études suggèrent que le stress oxydatif active la voie de signalisation de la PI3K/Akt/GSK-3, particulièrement intéressante, car elle est impliquée dans la plasticité synaptique et la survie neuronale [267]. En effet, il a été montré que l'induction chronique d'un stress oxydatif à des cellules de l'hippocampe de souris (HT22), via l'augmentation croissante de la dose de Fe<sup>2+</sup> active la voie de signalisation PI3K/Akt suivi d'une inhibition concomitante de la protéine GSK-3 [268]. Il est

maintenant bien établi que l'A $\beta$  induit un stress oxydatif en produisant de l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à travers la réduction d'ions métalliques. Ainsi, il a été montré que le traitement de cultures neuronales avec différentes doses d'A $\beta$  induit l'activation de la voie PI3K/Akt/GSK-3 et l'augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau au niveau de la thréonine 231 [269, 270].

La GSK-3 est la principale kinase impliquée dans la phosphorylation de la protéine tau. Elle joue donc un rôle crucial dans le fonctionnement de cette protéine. En effet, des études in vitro réalisées sur des cellules en culture utilisées comme modèle de neurodégénéscence suggèrent que les deux isoformes (GSK-3 $\alpha$  et GSK-3 $\beta$ ) peuvent induire l'hyperphosporylation de la protéine Tau en agissant sur différents épitopes impliqués dans la maladie d'Alzheimer [106, 271, 272]. En accord avec ces résultats, l'étude d'animaux transgéniques surexprimant la GSK-3ß présente une augmentation de la protéine Tau phosphorylée et une accélération de la neurodégénérescence [273, 274]. À l'inverse, l'inhibition de l'activité de GSK-3 par des inhibiteurs directs de la kinase ou par l'inhibition d'Akt permet de réduire la phosphorylation de la protéine Tau et améliore les fonctions cognitives des animaux transgéniques surexprimant GSK-3 [275, 276]. Une étude réalisée chez des souris transgéniques mutantes pour l'APP montre que les deux isoformes de GSK-3 sont hyperactivées [277]. Il est intéressant de noter que le traitement de neurones hippocampiques de rat avec de l'Aß 25-35 augmente l'activité de la GSK-3ß via l'inhibition de la PI3K. Ce résultat suggère donc que l'A $\beta$  en activant la GSK-3 $\beta$ serait lié à l'hyperphosphorylation de Tau [278]. De plus, l'administration de lithium, un inhibiteur spécifique de GSK-3 $\alpha$ , inhibe la production d'A $\beta$  en intervenant à l'étape du clivage par la  $\gamma$ -sécrétase cela suggère que, la GSK-3 $\alpha$  serait impliquée dans le clivage de l'APP. Ainsi, l'inhibition de la GSK-3α permettrait de réduire la formation des plaques d'Aß et les dégénérescences neurofibrillaires [279]. En prenant toutes ces informations en considération, l'inhibition de GSK-3 pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Malgré d'intenses recherches menées en ce sens, l'étiologie de la maladie d'Alzheimer est encore loin d'être élucidée, retardant donc la découverte de traitements curatifs. Il n'existe actuellement aucun traitement thérapeutique curatif et/ou étiologique pour la maladie d'Alzheimer. Seuls sont disponibles des traitements symptomatiques qui ont pour but de retarder le développement de la maladie et d'améliorer les conditions de vie des malades.



#### Figure 8 Modulation de la voie Akt dans la maladie d'Alzheimer

La voie de signalisation Akt module de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie, le métabolisme, etc. Akt est activée par la stimulation du récepteur membranaire qui induit phosphorylation de la PI3 K. Akt va ensuite, inhiber différentes voies de signalisation. (a) Dans des conditions pro-inflammatoires, les IKKs phosphorylent IKB libérant les sous-unités p50 et p65, permettant ainsi leur translocation dans le noyau et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de métalloprotéases. (b) Dans des conditions de stress oxydatif, Sirt 1 (noyau) sera activée et induira la synthèse de protéines ayant une activité antioxydante (FOXO) et induira la déacétylation de la protéine Tau et RARB. (c) La GSK-3 est inhibée par Akt via la phosphorylation de la Ser 21 (GSK-3 $\alpha$ ) et Ser 9 (GSK-3 $\beta$ ). GSK-3 $\alpha$  régule la production du peptide A $\beta$ , alors que GSK-3 $\beta$  est impliqué dans l'hyperphosphorylation de la protéine Tau.

#### 1.1.7 Les traitements utilisés

#### 1.1.7.1 Thérapie cholinergique ciblant la maladie d'Alzheimer

Les traitements développés actuellement reposent principalement sur l'hypothèse cholinergique. À ce jour deux types d'approches thérapeutiques ont été développés:

- Le remplacement des précurseurs de l'Ach (choline et lécithine) et ;
- L'utilisation d'inhibiteur de l'AchE afin de réduire la dégradation de l'Ach.

L'utilisation de précurseur cholinergique a été la première stratégie mise en place dans le but de remédier au déficit cognitif présent dans la maladie d'Alzheimer. Cependant, des études cliniques réalisées sur la choline et la phosphatidylcholine (lécithine) n'ont pas montré l'effet escompté [280]. Ainsi, d'autres précurseurs cholinergiques ont été développés tels que la cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) et la choline alphospherate. Il a été montré que ces deux composées sont capables d'augmenter le contenu vésiculaire et le relargage de l'Ach.

La CDP-choline est une intermédiaire dans la synthèse de la phosphatidylcholine. Elle est composée de la cytidine et de la choline liées par un pont diphosphate. Des études cliniques européennes et japonaises ont montré une amélioration des fonctions neurologiques, motrices et cognitives chez des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer. Au contraire, des études cliniques américaines n'ont clairement démontré aucun effet bénéfique de la CDP-choline. En vue de ce désaccord, plus d'études sont nécessaires afin d'émettre des conclusions quant à l'efficacité de la CDP-choline sur la mémoire [281]. La choline alphoscerate (alpha-glycerylphosphorylcholine) est un phospholipide qui peut traverser la barrière hémato encéphalique. Il entre dans la constitution de la membrane des cellules nerveuses. Des études précliniques réalisées sur le rat ont montré que la choline alphoscerate augmente la libération de l'Ach au niveau de l'hippocampe, améliore l'apprentissage et supprime les déficits de la mémoire induits par l'administration de la scopolamine [282]. Une revue de 103 études cliniques examinant 4 054 patients a évalué l'utilisation de la choline alphoscerate dans différentes formes de démence et les résultats obtenus suggèrent que le médicament pourrait avoir des effets bénéfiques, mais plus d'études sont nécessaires pour confirmer ces résultats [283]. Malgré les résultats positifs obtenus de ces deux traitements, ces études ne peuvent pas être généralisées, car le nombre de patients étudiés est faible.

L'utilisation d'inhibiteur de l'AchE a été introduite dans le traitement de la maladie d'Alzheimer dans les années 1990 avec de grandes attentes. C'est le cas par exemple de la tacrine, un inhibiteur réversible de l'AchE qui est le premier agent pharmacothérapeutique utilisé dans le traitement de la maladie d'Alzheimer dans de nombreux pays. Malheureusement, ce médicament possède de nombreux facteurs limitants tels que sa fréquence d'administration (quatre fois par jour), sa biodisponibilité, son hépatotoxicité et les effets secondaires qu'il génère (e.g. vomissement, douleurs abdominales, diarrhée) [284]. Ces effets indésirables ont été pris en considération dans le développement d'inhibiteurs de l'AchE de « seconde génération » (donépézil, rivastigmine et galantamine). Le donépézil et la galantamine ne nécessitent qu'une seule prise journalière. Ils ont respectivement un pic plasmatique atteint à 7 heures et 70 heures. Le temps de demi-vie de la rivastigmine est plus court; il est compris entre une et deux heures et nécessite deux doses par jour [285]. Ces traitements améliorent la qualité de vie du patient et permettent de réduire l'impact émotionnel pour le soignant de même que les frais de soins de santé [286]. Cependant, malgré ces résultats encourageants, l'efficacité de ces traitements reste encore un sujet de discussion, car uniquement 25 % des patients répondent au traitement et de nombreux effets secondaires persistent (e.g vomissement et nausée), ce qui cause la principale raison de leur abandon [13].

#### 1.1.7.2 Antagoniste des récepteurs NMDA (N-methyl-D-aspartate)

Il est clairement établi que les interactions entre l'Ach et le glutamate (principal acide aminé excitateur) sont essentielles dans les processus de mémorisation et d'apprentissage [287]. En effet, l'activation des récepteurs nicotiniques présynaptiques facilite la libération glutamatergique. Or, la transmission glutamatergique joue un rôle important dans le phénomène d'apprentissage et de mémorisation par l'activation des récepteurs ionotropiques (NMDA) induisant la potentialisation à long terme (LTP). Ainsi,

d'un point de vue fonctionnel, l'activation des récepteurs nicotiniques présynaptiques potentialise l'effet de la LTP induite par la transmission glutamertergique [288]. Donc, chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, la modification de la transmission cholinergique induirait une altération de la transmission glutamatergique, ce qui aurait pour conséquence l'apparition des troubles cognitifs causés par la libération continue de glutamate. De ce fait, l'utilisation d'antagoniste du récepteur NMDA permettrait de réguler le signal glutamatergique au niveau postsynaptique. À un stade avancé de la maladie d'Alzheimer, l'administration de la mémantine, un antagoniste non compétitif des récepteurs glutamatergiques NMDA, permettrait de contrebalancer le taux excessif de glutamate en partie responsable de l'augmentation des troubles mnésiques [289-292].

#### 1.1.7.3 Pharmacothérapie ciblant l'Aß

#### Les inhibiteurs des sécrétases

Comme décrit plus haut, la production d'A $\beta$  constitue un mécanisme important dans la maladie d'Alzheimer. Par conséquent, les sécrétases sont des cibles thérapeutiques intéressantes. Elles permettent la réduction de la formation de l'A $\beta$  soit en stimulant le clivage par  $\alpha$ -sécrétase (action directe sur la voie non-amyloidogénique), ou encore en supprimant les clivages induits par la  $\beta$  et/ou la  $\gamma$ -sécrétase (réduction de la quantité d'A $\beta$  produite via l'utilisation d'inhibiteur ou de suppresseur de ces sécrétases) [57]. Cependant, la majorité de ces agents n'agissent pas spécifiquement sur le clivage de l'APP ce qui aurait pour conséquence la modulation d'autres substrats qui pourraient induire l'apparition d'effets secondaires [293, 294]. L'augmentation de l'activité de la  $\alpha$ -sécrétase augmente la production du fragment sAPP- $\alpha$  connu pour son activité neuroprotectrice [295]. Cependant, les conséquences d'une surproduction chronique du fragment sAPP- $\alpha$  ne sont pas encore déterminées. Malheureusement, les études dans ce domaine sont entravées par un manque d'inhibiteurs sélectifs de la sécrétase- $\alpha$  et du caractère létal observé lors de l'ablation des gènes codant cette protéase [296].

La deuxième sécrétase impliquée dans la production d'A $\beta$ , BACE 1 est aussi une cible attractive. En effet, l'inhibition de la  $\beta$ -sécrétase pourrait en théorie diminuer la production de toutes les formes d'A $\beta$  incluant la forme A $\beta$ 1-42. De plus, des études

réalisées sur des souris transgéniques porteuses d'un gène inactif pour cette protéine ne présentent aucune aberration phénotypique apparente [297-299]. Il est par ailleurs intéressant de noter que la structure de la protéase est bien définie, permettant ainsi la conception d'inhibiteurs spécifiques [300]. Une étude réalisée sur des souris transgéniques (APPswe; PS1DE9; BACE1 +/-) en comparaison avec des souris transgéniques (APPswe; PS1DE9; BACE1 +/-) en comparaison avec des souris transgéniques (APPswe; PS1DE9; BACE1 +/+) âgées de 12 mois, présente une diminution significative des dépôts A $\beta$  [301]. Étant donné que BACE1 semble être impliquée dans de nombreux mécanismes physiologiques tels que la myélinisation [302, 303] et la plasticité synaptique, un ajustement prudent quant à sa modulation est nécessaire afin de réduire les potentiels effets secondaires.

Nonobstant la complexité de la  $\gamma$ -sécrétase avec ces quatre sous-unités (préséniline, nicastrine, APH-1 et PEN-2) et le manque d'information concernant leur rôle, de nombreux composés pouvant moduler ou inhiber cette protéase ont vu le jour. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que ces modulateurs de l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase peuvent altérer la production d'A $\beta$ . Il est vrai que de nombreux efforts ont été développés afin de créer des composés qui pénètrent dans le cerveau à des concentrations physiologiques sans interférer avec le clivage ainsi que la fonction d'autres substrats de la  $\gamma$ -sécrétase [304]. Plus de 30 substrats de la  $\gamma$ -sécrétase sont répertoriés [305], ce qui prouve clairement la toxicité potentielle que peut entraîner l'utilisation d'inhibiteurs de cette enzyme et l'intérêt particulier qu'il faut porter à la spécificité de la modulation afin de réussir à synthétiser un tel composé. Compte tenu des difficultés de spécificité rencontrées dans les tentatives d'inhibition de la  $\gamma$ -sécrétase, la modulation de son activité pourrait être une bonne alternative.

## Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)

En se basant sur des études épidémiologiques, il a été suggéré que le l'administration chronique d'AINS pourrait diminuer le risque de 50 % de développer la maladie d'Alzheimer [306-308]. Ainsi, l'utilisation de certains, AINS (sulfite de sulindac, ibuprofène, indométacine et flubiprofène) ont récemment attiré l'attention des chercheurs [309]. En effet, il a été montré que le traitement de différents types de cellules en culture

par ces composés inhibe spécifiquement le relargage du peptide A $\beta$ 1-42. Cependant, les résultats obtenus lors de différentes études cliniques n'ont pas été probants [310]. En effet, il a été montré que l'administration de l'hydroxychloroquine à des patients en phrase II sur une étude de 18 mois ne présente aucune différence significative comparativement aux patients recevant le placebo [311]. Ce manque d'efficacité est attribué en partie à sa faible biodisponibilité cérébrale lors de son administration par voie orale [312]. De plus, la prise d'AINS a pour conséquence de nombreux effets secondaires tels que des troubles du système cardiovasculaire et du système gastro-intestinal [313].

#### Les approches immunothérapeutiques

L'immunothérapie a été développée afin d'inhiber la formation d'A $\beta$  soluble et agrégée. Cette technique se base sur trois mécanismes : la solubilisation par un anticorps qui se lie à l'A $\beta$ , la phagocytose par la microglie de l'A $\beta$  opsonisée et l'élimination de l'Aβ du cerveau par des anticorps plasmatiques [314]. Ainsi, récemment de nombreux vaccins ont été développés et sont actuellement en phase 2 d'essais cliniques. Toutefois, malgré les résultats préliminaires positifs et encourageants de cette technique [315, 316], l'utilisation de ces vaccins comporte de nombreux inconvénients tels que le manque d'effets significatifs notables [317], la perte d'efficacité en fonction du temps ainsi qu'un coût élevé de production. De plus, ils constituent la cause de nombreux effets secondaires tels que l'apparition d'encéphalopathie, d'oedème vasogénique, d'angiopathie amyloïde cérébrale et de microhémorragie [314, 317-319]. Compte tenu du rapport avantages / inconvénients, il est aujourd'hui difficile de croire à l'efficacité de cette stratégie et donc plus d'études sont nécessaires afin d'améliorer et de mieux comprendre les mécanismes immunitaires mis en jeu, permettant de réduire les effets indésirables observés et liés à l'immunothérapie. Malgré les résultats obtenus par l'autopsie de cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer suggérant que l'immunothérapie réduit le dépôt d'  $A\beta$ , aucune réduction du niveau d'Aß présent dans les vaisseaux cérébraux et de l'hyperphosporylation de la protéine Tau dans les dégénérescences neurofibrillaires n'est observée [320-322]. De plus, les bénéfices cognitifs mesurés par de nombreux tests neuropsychologiques suggèrent une très faible amélioration comparée au groupe placebo [319]. Ainsi, ces études remettent en cause l'hypothèse de la cascade d'amyloïde dans

l'étiologie de la maladie d'Alzheimer suggérant que cette hypothèse serait une sursimplification de la pathogenèse de la maladie [323].

Actuellement, les traitements existant sur le marché sont peu efficaces, car ils permettent uniquement de réduire les symptômes sans soigner la maladie. En effet, plusieurs médicaments sont utilisés pour traiter certains symptômes tels que les troubles de la mémoire, des fonctions cognitives et de la motricité. Ainsi, même s'il n'existe aucun traitement à l'heure actuelle pour guérir les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ils pourront bénéficier d'une meilleure qualité de vie durant plusieurs années. En effet, les traitements utilisés pour traiter les symptômes légers à modérés sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Aricept<sup>MD</sup>, Exelon<sup>MD</sup>, Reminyl<sup>MD</sup>) et les traitements utilisés pour traiter les symptômes modérés à avancés sont des inhibiteurs des récepteurs NMDA (Ebixa).

Toutefois, ces traitements présentent des contraintes qui limitent leur utilisation à l'échelle clinique telle qu'une faible biodisponibilité cérébrale et de nombreux effets secondaires périphériques (vomissement, fatigue, étourdissement, pression artérielle, confusion, troubles digestifs, etc.,) poussant les patients à arrêter ce type de thérapie. Assurément, ces derniers ne sont que palliatifs, ils sont incapables de guérir la maladie ni même d'arrêter son évolution. Ils n'arrêtent en aucun cas la dégénérescence neuronale observée dans la maladie et donc au cours du temps, cette dégénérescence continue à progresser de la sorte que les traitements actuels n'auront plus d'effets sur celle-ci. Par ailleurs, ces thérapies ciblent principalement une seule voie thérapeutique or, l'éthologie de la maladie d'Alzheimer est multifactorielle ce qui suggère que les traitements ciblant plusieurs voies à la fois et principalement celles qui sont impliquées dans le stress oxydatif pourraient avoir un potentiel thérapeutique vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, les polyphénols constituent une approche prometteuse dans pour le traitement de la maladie d'Alzheimer compte tenu de leur caractère pléiotropique.

#### 1.1.7.4 Les antioxydants

#### 1.1.7.4.1 Les polyphénois

Les polyphénols sont très abondants dans notre alimentation. Ils sont particulièrement présents dans les légumes, les fruits et certaines épices ainsi que dans l'huile d'olive le thé vert et le vin rouge [324]. Ces composés sont intéressants, car ils sont non-toxiques et possèdent de nombreuses activités biologiques et pharmacologiques. Les polyphénols sont divisés en deux sous-groupes : les flavonoïdes et les nonflavonoïdes. Les flavonoïdes sont aussi divisés en deux groupes en fonction de la structure moléculaire de ces composants : les anthocyanines et les anthoxantines. Ce dernier est sous-divisé en sous-groupes : les flavanols, les flavones, les isoflavones et les catéchines [324, 325]. Cependant, leurs effets bénéfiques dépendent spécifiquement de la dose administrée et de leur biodisponibilité dans l'organisme. La biodisponibilité des polyphénols varie d'un individu à l'autre en fonction des conditions physiologiques propres à chacun. De plus, il est difficile de déterminer la consommation journalière en polyphénols du fait de leurs diversités dans notre alimentation. Leurs structures vont influencer leur absorption à travers le tractus gastro-intestinal, leurs métabolismes et leurs activités biologiques [326]. La plupart des polyphénols sont peu absorbés au niveau de l'intestin, hautement métabolisés et rapidement éliminés. En général, ces composés sont hydroxylés, méthoxylés et/ou glycosylés à l'exception des catéchines. Ils sont principalement composés de deux types de sucres : le glucose et le rhamnose. Les polyphénols composés de glucose vont être majoritairement absorbés au niveau de l'intestin grêle sous l'action de la bêta-glucosidase-cytosolique hydroxylase [326, 327]. Tandis que, les polyphénols composés de rhamnoses sont dégradés par des rhamnosidases au niveau de la microflore du côlon [326]. Quant aux catéchines, elles sont absorbées sans déconjugaison ni hydrolyse [326]. Bien que la concentration plasmatique des polyphénols soit très faible (n'excédant pas 1 µM) avec un maximum qui est atteint une à deux heures après l'ingestion [325], il a été montré qu'un régime riche en polyphénols peut augmenter le niveau d'antioxydants plasmatiques ce qui suggère leur efficacité potentielle contre les dommages induits par le stress oxydatif [324, 325, 328].

#### 1.1.7.4.2 Activité neuroprotectrice des antioxydants

Du fait de leur activité biologique et antioxydante, les flavonoïdes sont la classe de polyphénols la plus étudiée. De plus, de nombreuses études cliniques et épidémiologiques [329] ont révélé une influence des habitudes alimentaires sur les maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer. Par exemple, une étude clinique réalisée en France appelée Personnes Âgées Quid (PAQUID) suggère que la consommation de trois à quatre verres de vin par jours réduit de 80 % le risque de développer la maladie d'Alzheimer en comparaison avec des sujets consommant peu ou pas du vin [330]. Cette étude a été poursuivie par une autre étude clinique répartie sur 5 ans entre 1991 et 1996 sur 1 367 sujets âgés de plus de 65 ans. Les résultats indiquent qu'une alimentation supplémentée en flavonoïdes réduit significativement les risques de démence. Dans cette étude, les sujets reçoivent un régime composé de 14,4 mg de flavonoïdes provenant des fruits (35,2 %), des légumes (19,1 %), du vin (16,9 %) et du thé (16,0 %) [331]. Cette étude est corroborée par une étude épidémiologique réalisée à New York sur une cohorte de 194 patients souffrant de la maladie d'Alzheimer comparée à 1 790 témoins, les patients reçoivent une diète méditerranéenne composée d'une quantité importante de fruits, de légumes, de céréales, de poissons, d'huile d'olive, d'une quantité modérée d'alcool et d'une faible quantité de viande rouge et de produits laitiers. Les résultats obtenus suggèrent que cette diète est associée à un faible risque d'avoir la maladie d'Alzheimer [332]. En effet, la diète méditerranéenne est composée principalement d'antioxydants [333, 334] tels que les vitamines C, E et B12, [335, 336] les folates, les flavonoïdes [324, 325, 337], le resvératrol, la carotène et les acides gras insaturés [338] ainsi que de nombreux micronutriments qui pourraient avoir des effets bénéfiques sur cette maladie. En se basant sur des résultats intéressants obtenus suite aux épidémiologiques montrant un effet bénéfique de polyphénols sur la maladie d'Alzheimer, de nombreux chercheurs se sont intéressés à l'effet neuroprotecteur des polyphénols provenant de l'alimentation telle que : les catéchines du thé vert, les polyphénols des bleuets et de la grenade, le resvératrol, les composés de l'huile d'olive, le Ginko biloba et le curcumin. Effectivement, de nombreuses études in vitro ont montré que ces composés ont une forte activité antioxydante en piégeant les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote [339]. Compte tenu du vaste champ d'études sur ce domaine,

seulement certaines études expérimentales seront citées dans ce manuscrit (Tableau 1-3) [325].

#### Les composés de l'huile d'olive :

La diète méditerranéenne est associée à une faible incidence d'athérosclérose, de maladie cardiovasculaire, de certains cancers et de maladies neurodégénératives. Les effets bénéfiques de cette diète ont été partiellement attribués aux effets biologiques des polyphénols présents dans l'huile d'olive qui est un composé très riche en acide gras mono-insaturé. Les principaux polyphénols extraits et purifiés de l'huile d'olive sont l'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'oleuropéine. En effet, le rapport de nombreuses études réalisées sur l'homme, *in vitro et in vivo* suggère que l'huile d'olive réduit le niveau de lipoprotéines plasmatiques, l'inflammation et le stress oxydatif [340]. Il a été montré que son activité antioxydante provient de sa capacité à piéger les radicaux libres [341].

#### Le Ginko biloba :

Le Ginko biloba est utilisé depuis des centaines d'années dans la médecine traditionnelle chinoise. L'extrait standardisé du Ginko biloba est le EGb 761 qui est connu depuis plus de 30 ans. L'EGb 761 est composé de 24 % de flavonoïdes et de 6 % de terpènes qui lui confèrent son activité biologique et neuroprotectrice [324, 342]. De plus, les résultats obtenus suite aux études *in vitro* et *in vivo* indiquent que l' EGb 761 est un composé anti-apoptotique antioxydant [343] et anti-amyloïdogénique [344].

#### Les catéchines du thé vert :

Les chercheurs se sont particulièrement intéressés aux bienfaits du thé vert, car il possède de nombreux effets bénéfiques pour l'organisme. Celui-ci possède de nombreuses propriétés antioxydantes essentielles à l'organisme. En effet, il a été montré, qu'il peut prévenir non seulement certains cancers [329] mais aussi certaines maladies cardiovasculaires [345]. Le thé vert est doté aussi d'une activité anti-inflammatoire et neuroprotectrice [346], ce qui suggère que ce dernier est un excellent agent thérapeutique.

Le thé vert est un composé riche en flavonoïdes (30 % du poids sec des feuilles) [347], il est composé principalement d'épigallocatéchine-gallate (EGCG) (60 %), suivie de 10 % d'épigallocatéchine (EGC), d'épicatéchine (EC) et d'epicatéchine-3-galatte (ECG) [348]. En somme, les catéchines sont des excellents piégeurs de radicaux libres et de puissants antioxydants. Leurs propriétés bénéfiques résultent des groupements hydroxyles qui confèrent aux catéchines leur capacité antioxydante. Ainsi, plus le nombre de groupements hydroxyles augmente, meilleure est leur capacité antioxydante [349].

#### Les polyphénols des bleuets:

Les baies sont des composés riches en polyphénols tels que les anthocyanines, les proanthocyanines et certains flavonoïdes [325]. La quantité de polyphénols varie en fonction de la maturité du fruit et de son environnement de culture. Par exemple, les bleuets sont composés principalement de catéchines atteignant 387 mg/ 100g et de 84 à 113 mg /100 g d'anthocyanine [350]. Il est intéressant de noter qu'après l'administration de 100 g de bleuets, 1,2 g d'anthocyanine a été retrouvé dans le sérum suggérant ainsi un possible effet antioxydant de ces composés au niveau du cerveau [351].

## Le résveratrol :

Ce composé est connu pour ses nombreux effets : antioxydant [352], antiinflammatoire [353], anticancérigéne [354], antimutagénique [352] et neuroprotecteur [355]. Le résveratrol fait parti des polyphénols non-flavonoïdes, il est présent dans les raisins, le vin rouge et les baies. La quantité de résveratrol présente dans un verre de vin est comprise entre 1,5 -3 mg par litre. Il existe deux formes de resvératrol une forme inactive, le cis-resvératrol et une forme active le trans-resveratrol (trans-3,4,5trihydroxystilbéne) [325].

## Le curcumin

En raison de son puissant pouvoir antioxydant et de ses multiples propriétés médicinales, le curcumin fera l'objet d'une étude plus poussée au cours de ce travail de thèse. Son historique, ses propriétés pharmacologiques, sa structure chimique, etc... seront détaillés dans le chapitre 1.2.

	Effets	modèles	polyphénols	références
Effets sur la voie Aβ	<ul> <li>Augmentation de l'activité de l'α-sécrétase</li> <li>Réduction de la production des fibrilles de l'Aβ et des plaques séniles</li> <li>Protection de l'agrégation de α-synucleine</li> <li>Réduction de l'activité de la β-sécrétase</li> </ul>	Neurones primaires (Tg2576) rat, cellules SwAPP HEK293 Insulinome de rat (INS-1)	Catéchines (ECGC) Thé vert	[356-358] [359]
	<ul> <li>Réduction du taux d'ARN codant BACE-1</li> <li>Réduction des fibrilles d'Aβ</li> <li>Réduction des dépôts d'Aβ et des plaques séniles</li> <li>Activation de la voie non- amyloïdogénique</li> </ul>	Tg2576, PC12 phéochromocytome, Hippocampe de rat, Rat Srague-Dawley	Curcumin	[360-365]
	<ul> <li>Remodelage d'oligomères solubles et de fibrilles sous forme non-toxique d'Aβ</li> <li>Réduction <i>in vitro</i> de la production d'Aβ</li> </ul>	Souris Tg2576, Cellules de l'hippocampe de rat, Cellules SwAPP <sub>692</sub> - HEK293 Cellules SwAPP <sub>692</sub> - N2a	Resvératrol (Cabernet de Sauvignon)	[366-369]

#### Tableau 1-3 Effets bénéfiques de certains polyphénols contre la maladie d'Alzheimer

	<ul> <li>Réduction de l'accumulation de la fraction soluble et des fibrilles d'Aβ</li> </ul>	Tg2576	Jus de grenade	[370]
Inhibition de l'AchE	<ul> <li>Améliore les déficits cognitifs</li> </ul>	souris ICV scopolamine	Catéchines	[371]
Protection cellulaire	<ul> <li>Protection contre la toxicité induite par l'Aβ</li> <li>Réduction de l'activité caspase induite par l'Aβ (hippocampe)</li> <li>Protection contre la toxicité induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> </ul>	Neurones d'hippocampe de rat, Cellules INS-1 PC12 Neurones d'hippocampe de rat, PC12	Catéchines Curcumin Resvératrol	[359, 372- 374] [375] [368, 376- 378]
Effet anti- inflammatoire	<ul> <li>Réduction des cytokines (IL-1, IL6, IL8, VEGF, PG-2) induites par l'Aβ</li> <li>Réduction des cytokines (TNFα, IL-1β) et des chémokines (MIP, MCP et IL-6) induites par l'Aβ</li> </ul>	Astrocytome humain U373MG Monocytes humains	Catéchines Curcumin	[379] [363, 380]
Marqueur de stress oxydatif	<ul> <li>Réduction du niveau de lipides oxydés induits par l'Aβ</li> <li>Réduction des protéines oxydées induites par l'Aβ</li> <li>Diminution des espèces réactives à l'oxygène (ONOO') des lipides oxydés et fragmentation de l'ADN</li> <li>Protection contre la toxicité induite par l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> </ul>	Culture primaire de neurones d'hippocampe de rat; ICV Aβ Rat wistar Tg 2576 Rats- streptozotocines diabétiques Cellules PC12	Catéchines Curcumin Resvératrol	[373, 381] [363] [378, 382, 383]

Effets sur la densité synaptique	<ul> <li>Augmentation des protéines post synaptiques 95</li> </ul>	Rats Sprague- Dawley (22mois)	Curcumin	[365]
Déficits cognitifs	<ul> <li>Réduit les déficits cognitifs chez l'animal</li> </ul>	Rat ICV Aβ (1-40) Tg2576 Sprague –Dawley Modèle de rats de type forme sporadique de la maladie d'Alzheimer Rats- streptozotocines Souris transgéniques APP/PS1	Catéchines Curcumin Resvératrol Fraise, épinard bleuet	[356, 381] [365, 384] [382, 383] [385-387]

## 1.2 Le curcumin

# **1.2.1** Historique : une médecine traditionnelle orientale pour une application médicale moderne

Le curcumin est l'une des plantes médicinales qui a le plus attiré l'attention des scientifiques. Il provient du rhizome séché et broyé d'une plante de la famille des curcuminoïdes. Cette plante herbacée, curcuma longa (c. longa) est cultivée en Inde, en Chine, à Taiwan, au Japon, en Indonésie et en Afrique, mais l'Inde en est le plus grand producteur et consommateur au monde. Le c. longa appartient à la famille des zingibéracées, de la même famille que le gingembre (Zingiber). Il correspond à une courte tige d'environ 100 cm de long. Il est très largement utilisé comme épice à travers le monde. Son nom varie d'un pays à l'autre, par exemple : 'Haldi' en Hindi, 'Chiang huang' en Chinois, 'ukon' en Japonais, 'haridra' ou 'gauri' en Sanscrit et 'korkom' en Arabe. En plus d'être utilisé comme épice, le curcumin est aussi utilisé comme colorant alimentaire, colorant pour textile, conservateur alimentaire et, depuis des milliers d'années, il est utilisé dans la médecine Ayurvédique et Chinoise. Entre le 12<sup>iéme</sup> et 13<sup>iéme</sup> siècle, il a été introduit dans les pays occidentaux par la traite des esclaves arabes et Marco Polo après leur visite de l'Inde [388]. Encore aujourd'hui, le curcumin est toujours couramment utilisé comme agent médicinal alternatif dans de nombreuses régions du sud et de l'est de l'Asie. Il a été démontré que la prévalence de la maladie d'Alzheimer dans la population Inde-Asie était très faible, ce qui a conduit certains chercheurs à émettre l'hypothèse que le curcumin avait des effets bénéfiques sur les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Depuis les dix dernières années, le nombre d'études sur le curcumin a augmenté significativement, ce qui a permis l'identification des nombreuses cibles pharmacologiques, que nous avons récemment résumées dans la revue (Annexe 2) [389].

#### 1.2.2 Aspect pharmacologique du curcumin

#### 1.2.2.1 Relation structure-activité et activité antioxydante du curcumin

Le curcumin est principalement composé de démethoxycurcumin (curcumin I), de bismethoxycurcumin (curcumin II) et de cyclocurcumin (curcumin III) [390]. Le

curcumin commercial (ou les curcmunins) comprend 77 % de curcumin I, 17 % de curcumin II et 3 % de curcumin III (Figure 9).



## Figure 9 Structure chimique des curcuminoïdes (curcumin I, curcumin II et curcumin III) et de leurs groupements réactifs (d'après Belkacemi, Doggui et Ramassamy 2010, Expert Review in Molecular Medicine).

De nombreuses études *in vitro* ont montré que les curcumins sont de puissants antioxydants. En effet, ces composés sont capables de piéger (rôle « scavenger ») les anions superoxydes  $O_2^-$  et OH<sup>-</sup> en conservant le niveau du GSH tout en diminuant la concentration des sous-produits de l'oxydation des macromolécules par exemple, en protégeant de la peroxydation lipidique et de l'oxydation de l'ADN [391-393]. De nombreuses études réalisées sur des modèles animaux ont indiqué que les curcumins protègent différents organes tels que le cerveau, le foie, les poumons, les reins et le cœur contre le stress oxydatif. En effet, chez le rat, le curcumin réduit les espèces réactives de l'oxygène dans les macrophages péritonéaux [394], réduit le niveau de peroxydation lipidique dans le cerveau et dans les microsomes du foie [395]. Récemment, nous avons également démontré que le curcumin pouvait protéger les cellules SK-N-SH contre le stress oxydatif induit par l'acroléine (Annexe 1) [230].

De plus, chez les rats Wistar albinos les curcumins protègent contre la néphrotoxicité induite par les acétaminophènes (antalgiques) en réduisant le niveau de malondialdéhyde (sous-produit de la peroxydation lipidique) et en augmentant l'activité du GSH, de la GSH peroxydase, de la catalase et de la superoxyde dismutase [396]. Les curcumins protègent également les rats du stress oxydatif induit par l'arsenite de sodium (herbicide) au niveau du foie, des testicules, du cerveau, des reins et des poumons en augmentant l'activité de la GSH transférase et de la catalase [397]. Il a aussi été montré chez un modèle de rats diabétiques que le curcumin réduit les dommages oxydatifs causés sur l'ADN et sur les protéines au niveau du cœur [398]. Par ailleurs, une étude réalisée chez les rats Wistar démontre que le curcumin et le déméthoxycurcumin (mais pas le bisméthoxycurcumin), bloquent la diminution du taux du GSH et de l'oxydation des protéines au niveau de l'hippocampe [399], alors qu'une étude réalisée sur des cellules cancéreuses montre que le bismethoxycurcumin contrôle plus efficacement le niveau des espèces réactives de l'oxygène que le curcumin et qu'il agirait également sur l'inhibition de la voie NF-kB induite par TNFa (Tumor Necrosis Factor, cytokine impliquée dans l'inflammation) [400]. Ces résultats restent cependant très controversés [401]. Étonnamment, il a été montré qu'en présence de concentrations élevées d'ions métalliques, les curcumins ont un effet pro-oxydant contribuant à la génération des espèces réactives de l'oxygène et, par conséquent, induisant l'apoptose des cellules cancéreuses. Ces résultats suggèrent donc que les curcumins ont un effet anti-cancérigène [402, 403].

Le principal facteur pouvant expliquer la forte capacité antioxydante du curcumin in vitro est le transfert de l'électron libre provenant du groupement  $\beta$ -cétoénolique vers le groupement phénolique (Figure 10) [404-407]. En effet, le piégeage des radicaux libres par le curcumin est lié à la formation du radical phénoxyle formé par la déprotonation du groupement phénol [408]. Or, la chélation des métaux est fortement rattachée à la mobilité et à l'acidité du proton appartenant au groupement énol [409]. Il est intéressant de souligner que le curcumin et ses analogues n'ont pas la même activité antioxydante. Cette différence d'activité proviendrait, de ce fait, du seul groupement qui diffère entre ces composés : le groupement **méthoxy**. En effet, le curcumin a une meilleure efficacité antioxydante que le déméthoxycurcumin et que le bisdéméthoxycurcumin qui est pratiquement inactif.

Malheureusement, seulement quelques études se sont intéressées à l'effet antioxydant des métabolites du curcumin. D'ailleurs, une étude comparative entre le curcumin et ses dérivés hydrogènes (Figure 10) expose des résultats surprenants en suggérant que le térahydrocurcumin et l'octahydrocurcumin ont une activité de piégeage des radicaux libres supérieure à celle du curcumin en utilisant le test du 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et l'héxahydrocurcumin inhibe plus efficacement le 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), suggérant donc un rôle important de l'hydrogénation au niveau de la double liaison de la chaîne carbonée (sept carbones) et du β-dicétone du curcumin. Ainsi, l'hydrogénation serait liée à l'augmentation de l'activité antioxydante du curcumin [407]. Une étude réalisée sur un modèle de rats diabétiques induit par l'injection de la streptozotocine-nicotiamide montre que l'administration de tétrahydrocurcumin est liée à la diminution significative des sousproduits de la peroxydation lipidique tels que les substances réactives aux tiobarbituriques dans le sérum et les tissus et active plus efficacement les enzymes antioxydantes (SOD, catalase, GSH et glutathion-s-transférase) que le curcumin [410-412]. Cependant, contrairement au curcumin le tétrahydrocurcumin n'induit ni l'expression de la hème oxygenase-1 (HO-1) (protéine impliquée dans la l'homéostasie redox et dans la régulation négative de l'inflammation) ni la translocation du facteur de transcription Nrf2 dans les macrophages RAW264.7 [413].

En résumé, les mécanismes d'action du curcumin sous-jacents à son activité antioxydante par piégeage des radicaux libres ne sont pas pleinement compris et restent controversés. Cependant, en fonction de la nature des radicaux libres, les groupements phénoliques et  $\beta$ -céto-énolique sont responsables de son activité antioxydante. Par exemple, le groupement phénolique réagit avec le DPPH et le CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, alors que le groupement  $\beta$ -céto-énolique réagit avec O<sub>2</sub><sup>-</sup> et <sup>1</sup>O<sub>2</sub> [414].



Figure 10 Voie métabolique du curcumin chez le rat (d'après Belkacemi, Doggui et Ramassamy 2011, Expert Review in Molecular Medicine)
#### 1.2.2.2 Effet anti-inflammatoire du curcumin

Comme nous l'avons vu précédemment, la neuro-inflammation joue un rôle clé dans le développement de la maladie d'Alzheimer. De nombreuses études soutiennent que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B joue un rôle central dans la voie de signalisation impliquée dans l'inflammation. Le curcumin possède une très forte activité antiinflammatoire. En outre, le groupe d'Aggarwal a été le premier à démontrer que le curcumin peut inhiber le facteur de transcription NF-kB. Cette capacité du curcumin a été démontrée via l'utilisation d'inducteur de la voie NF-kB, tel que l' H2O2 sur les cellules provenant d'une leucémie mésoblastique (ML-1a) probablement en piégeant les radicaux libres [415]. De plus, le curcumin prévient l'activation de la voie NF- $\kappa$ B induite par le LPS (lipopolysaccharide) [416] ou le TNF- $\alpha$  [417]. Le curcumin diminue également la libération des médiateurs inflammatoires de manière dose-dépendante en modulant l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que : IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ , induites par un traitement au LPS chez les cellules migrogliales BV2 [416]. Il supprime également la libération de prostaglandine 2 (PGE<sub>2</sub>) et de NO<sup>-</sup> et réduit l'expression d'iNOS et de l'ARNm de la cyclooxygénase-2 (COX-2) [416, 418]. Il affecte le métabolisme de l'acide arachidonique en bloquant l'activité de la lipoxygénase (LOX), enzyme qui catalyse l'oxydation des acides gras. En effet, il est capable de bloquer la phosphorylation de la phospholypase cytosolique (cPLA2) et d'inhiber 5-LOX dans les macrophages de souris (les cellules RAW264.7) et dans les cellules de colon humain les HT-29 [419]. Le mécanisme impliqué dans la réduction de cPLA2 par le curcumin nécessite la diminution de la phosphorylation des sites spécifiques de la MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) [420]. Le curcumin est également un agoniste des récepteurs nucléaires PPARy (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma). Les récepteurs PPARy jouent un rôle important dans le métabolisme des acides gras, mais également dans l'inflammation. Le curcumin, en activant les récepteurs PPARy, inhibe la voie de signalisation proinflammatoire astrocytaire induite par l'A\beta25-35 [418]. Le curcumin et du thétrahydrocurcumin exercent des effets anti-inflammatoires en réduisant le niveau d'IL- $\beta$  chez des modèles de souris de la maladie d'Alzheimer, les souris Tg2576 [363, 421].

#### 1.2.2.3 Effet du curcumin sur la cascade amyloïde

L'une des stratégies développées pour traiter la maladie d'Alzheimer est l'inhibition des plaques d'amyloïde et l'agrégation des fibrilles d'AB. À cet égard, de nombreuses études in vitro ont montré que le curcumin peut se lier à l'Aß et inhiber son agrégation. Effectivement, sur 214 antioxydants testés, le curcumin est le plus fort inhibiteur de la formation des fibrilles d'A $\beta$  [422]. Il a un effet dose-dépendant sur l'inhibition des fibrilles d'AB1-40/1-42 et déstabilise les protofibrilles déjà formées [360]. De plus, des études réalisées sur des cultures primaires de neurones corticaux de rats suggèrent que le curcumin réduit le niveau d'Aß mais également le niveau de l'APP [423]. Ces résultats in vitro mettent en évidence des possibles mécanismes cellulaires permettant d'expliquer les effets positifs du curcumin sur la réduction des dépôts d'Aß observée chez les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. Malgré sa faible biodisponibilité, le curcumin traverse la barrière-hémato-encéphalique par diffusion, permettant ainsi sa liaison aux plaques séniles [362]. Il a été montré que la majorité des principes actifs hydrophobes est expulsée hors de la cellule par les P-gp (par exemple certains agents anti-cancereux), mais dans le cas du curcumin des études ont montré qu'il inhibait les P-gp et ceux-ci ne sont pas expulsés de la cellule même s'il s'agit de molécules hydrophobes [424]. Les P-gp appartiennent à la famille des transporteurs ABC (transporteurs à ATP Binding Cassette). Elles sont principalement exprimées au niveau des cellules intestinales, des hépatocytes, des cellules rénales et des cellules endothéliales [425, 426]. D'ailleurs, une étude in vivo réalisée à l'aide d'un système d'imagerie multiphotonique a démontré que l'administration de curcumin pendant une semaine, à un modèle de souris transgéniques de la maladie d'Alzheimer (souris doubles mutantes APPSwe/PS1 dE9), réduisait de 30 % la taille des plaques [362]. De plus, dans le but d'évaluer le mode d'action de ce composé sur la maladie d'Alzheimer, une faible concentration (160 ppm) et forte concentration (200 ppm) de curcumin ont été administrées oralement à des souris Tg2576. Les résultats obtenus sont surprenants, car uniquement la faible dose de curcumin a diminué le plus le niveau d'Aß, soluble et insoluble, et le dépôt de plaques au niveau de l'hippocampe et du cortex [363]. Une étude réalisée sur ces mêmes souris transgéniques, traitées avec 1,25 mg/jour de curcumin et du

58

tétrahydrocurcumin pendant quatre mois, correspondant à la période de formation des plaques (animaux âgés entre 12-16 mois), démontre qu'uniquement le curcumin réduit l'apparition de plaques et le niveau d'agrégation de l'A $\beta$ . Cette étude souligne particulièrement le rôle important du groupement dicétone du curcumin dans la réduction du dépôt de plaques d'amyloïde [421].

#### 1.2.2.4 Effet du curcumin sur l'hyperphosphorylation de la protéine Tau

Comme l'avons décrit précédemment nous (chapitre 1.1.4.2), l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et les dégénérescences neurofibrillaires sont des marqueurs de la maladie d'Alzheimer pouvant induire la mortalité cellulaire. Ainsi, afin de traiter cette pathologie, il est important d'inhiber l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. A cet égard, le curcumin semble être un composé intéressant du fait qu'il inhibe l'hyperphosphorylation de la protéine Tau induite par l'Aß, in vitro chez les cellules PC12. Dans cette étude, les effets de l'Aß et du curcumin sur la phosphorylation de la protéine Tau ont été mesurés à l'aide d'un anticorps anti-phospho-Tau (AT8) qui reconnaît la phosphorylation sur la sérine 202 [427]. Ces résultats ont été récemment confirmés par l'étude de Huang et collaborateurs (2014) qui ont montré que le curcumin est capable d' inhiber l'hyperphosphorylation de la protéine Tau via l'activation de la voie de signalisation PTEN/AKT/GSK3 chez lez cellules SH-SY5Y. Plus précisément, les auteurs suggèrent que le curcumin empêche la phosphorylation de la protéine Tau au niveau de la thréonine 231 et de la sérine 396 et diminue la phosphorylation de la GSK-3β au niveau de la sérine 9 [428]. De plus, il a été démontré que l'administration de 500 ppm de curcumin pendant 4 mois à des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer (âgés de 5 mois) développant des dépôts d'amyloïdes et d'hyperphosphorylation de la protéine Tau (3xTg), réduit significativement la phosphorylation de la celle-ci au niveau de la sérine 422 [429].

D'après les études *in vitro* et *in vivo* citées précédemment, il en résulte que le curcumin protège de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Ainsi, il semblerait que celui-ci serait un puissant candidat dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

#### 1.2.2.5 Études cliniques du curcumin dans la maladie d'Alzheimer

Compte tenu des effets observés in vivo du curcumin sur l'inflammation et sur la cascade amyloïde, quatre études cliniques ont été réalisées à ce jour, mais seules deux ont été complétées. L'une d'entre elles est une étude pilote effectuée en double-aveugle à Hong-Kong, qui consistait à administrer une combinaison de curcumin (1 g/jour ou 6 g/jour) avec du Ginko Biloba (120 mg/jour) pendant six mois à des patients possiblement ou probablement atteints de la maladie d'Alzheimer. En revanche, aucune amélioration du score au Mini-Mental-Test (test d'évaluation des fonctions cognitives et de la capacité mnésiques) et du niveau d'A $\beta$  n'ont été observés chez ces patients en comparaison avec le groupe contrôle. La seconde étude réalisée aux États-Unis est également une étude en double-aveugle, de phase II, effectuée sur des patients atteints du stade moyen ou modéré de la maladie d'Alzheimer. Ces patients ont reçu entre 2 et 10 mg de curcumin pendant six mois. Les résultats ne montrent aucune amélioration significative des fonctions cognitives, ni du niveau d'AB, ni de la protéine Tau totale et sous la forme hyperphosphorylée, dans le plasma et dans le liquide céphalorachidien [430]. Les deux autres études sont toujours en cours. La première s'effectue à Mumbai, en Inde. C'est une étude clinique de phase III où les patients reçoivent 2 ou 3 g/jour de Longvida® curcumin (curcumin encapsulé dans des particules solides-lipides [431, 432]), alors que la seconde est réalisée aux États-Unis où les patients reçoivent une combinaison de curcumin (5,4 g/jour) et de bioperine (inhibiteur hépatique et intestinal de la glucoronidation) [433]).

Il est prématuré de conclure sur l'effet du curcumin dans la maladie d'Alzheimer, car le nombre d'études cliniques réalisé à ce jour est insuffisant. Il faudrait augmenter le nombre de patients testés ainsi que la période de traitement afin de véritablement déterminer l'action du curcumin. Les résultats obtenus sont cependant étonnants, car aucun effet du curcumin n'est observé sur les deux études completées. Cela suggère donc que ce composé possède des limitations quant à son application thérapeutique.

#### 1.2.2.6 Les limitations du curcumin

Le curcumin est un composé non-toxique et relativement bien toléré par l'organisme, et ce, même à de fortes concentrations. Une étude clinique de phase I a d'ailleurs montré que l'administration par voie orale d'une dose de curcumin à des concentrations allant de 500 à 8 000 mg par jour pendant trois mois n'est pas toxique chez l'homme [434]. La concentration journalière de curcumin définie par l'Organisation mondiale de la Santé est de 0-1 mg/kg. Cependant, ses propriétés physico-chimiques réduisent son activité biologique. En effet, il est soluble dans l'acétone, l'éthanol et l'acide acétique, mais particulièrement insoluble dans l'eau, ce qui est la principale cause de sa faible biodisponibilité systémique. De plus, c'est un composé photosensible, c'està-dire qu'il se dégrade rapidement à la lumière [435]. Par ailleurs, il est stable dans les pH acides (compris entre 1 et 6). Par conséquent, il est stable au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle, mais instable dans les pH neutres à basiques, donc instable dans le sang (pH se situant entre 7,35 et 7,45). La majorité du curcumin est dégradée en 6-(4'hydroxy-3'-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexenal et une minorité en vanilline, acide férulique et en méthane de féruole [436].

Ainsi, les différents facteurs énumérés ci-dessus, contribuent principalement à la faible biodisponibilité systémique du curcumin lors de son administration par voie orale [437] (Tableau 1-4). L'étude de Yang et collaborateurs (2007) a montré que la concentration de curcumin retrouvé dans le sérum après l'administration de 500 mg/kg par voie orale était 50 fois plus faible que l'administration de 10 mg/kg par intraveineuse (i.v). De plus, 40 % du curcumin administré par voie orale est directement éliminé par les fèces. Par ailleurs, du fait de sa faible solubilité dans l'eau, son administration par i.v réduit considérablement son temps de demi-vie, passant à 28,1  $\pm$  5,6 heures au lieu de 44  $\pm$  7,5 heures par voie orale [438]. Il serait donc important d'augmenter sa solubilité apparente dans l'eau et aussi sa protection contre la forte dégradation présente dans les milieux biologiques

Modèle	Dose administrée	Résultats pharmacocinétiques (Sérum)	Durée d'apparition	Réfs
Souris	1.0 g/kg	- 0.13 μg/mL - 0.22 μg/mL	15 min 1 h	[439]
Rat	800 mg/kg	<ul> <li>Pas de curcumin dans le sang du cœur</li> <li>Trace dans la veine porte &lt;5μg/mL</li> </ul>	15 min à 24h	[440]
Rat	500 mg/kg	0.06 ± 0.01 μg/mL	41.7 ± 5.4 min	[438]
Rat	2 g/ kg	1.35 ± 0.23 μg/mL	0.83 h	[433]
Humain	2 g/ kg	0.006 ± 0.005 μg/mL	1 h	[433]
Humain	4 à 8 mg/kg	0.4–3.6 μM	1h à 2h	[441]

Tableau 1-4 Biodisponibilité systémique du curcumin après son administration par voie orale chez le rat, la souris et l'homme.

Des études ont récemment montré que les cellules Caco-2 (lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique) étaient faiblement perméables aux curcumin. Ces cellules ont la capacité de se différencier spontanément en cellules intestinales polarisées pour former un épithélium mimant une barrière intestinale fonctionnelle. L'utilisation d'un inhibiteur des transporteurs P-gp (vérapamil) suggère que le transport du curcumin se fait par simple diffusion à travers l'épithélium intestinal. De plus, le curcumin a tendance à s'accumuler dans les cellules, réduisant ainsi son absorption à travers le tractus gastro-intestinal [442]. Il semble que le curcumin est très rapidement métabolisé au niveau du foie formant : (1) le hexahydrocurcumin glucuronide et le hexahydrocurcuminol probablement à travers les intermédiaires dihydrocurcumin et tétrahydrocurcumin; (2) le glucuronide sulfate via conjugaison et sulfatation du curcumin (Figure 10) [443]. Cependant, le principal métabolite du curcumin reste encore sujet à controverse [439, 444].

Compte tenu de la faible biodisponibilité systémique du curcumin, il est difficile de déterminer précisément son absorption et sa distribution tissulaire. Or, ceux sont des facteurs prédominants à étudier, afin de déterminer son activité pharmacologique. Seules quelques études ont abordé cette question (Tableau 1-5). La concentration maximale de curcumin dans les tissus est obtenue une heure après l'administration [439] et après trois à six heures, son taux diminue rapidement [445].

Animaux	Mode d'administration / durée de traitement	Dose/ durée de traitement	Tissus	Concentrations	Réfs
Souris	Intraveineux (i.v)	100 mg/kg	Intestin	117± 6.9 μg/g	[439]
	1 dose unique		rate	26.1±1.1 μg/g	
			foie	6.9 ± 2.6 μg/g	
			rate	7.5±0.08 μg/g	
			cerveau	0.4±0.01 µg/g	
Souris	i.v	100 mg/kg	Muqueuse	200±23nmol/g	[445]
	10 jours		intestinale	78 ± 3 nmol/g	
	d'injection		reins	73 ± 20 nmol/g	
			foie	$16 \pm 3 \text{ nmol/g}$	
			poumons	9.1 ± 1.1 nmol/g	
			cœur	$8.4 \pm 6 \text{ nmol/g}$	
			muscle	2.9 ± 0.4 nmol/g	
			cerveau		

Tableau 1-5 Distribution tissulaire du curcumin chez la souris après administration par voie intraveineuse.

Tel que vu précédemment, le curcumin semble être un composé adéquat pour une application thérapeutique afin de traiter la maladie d'Alzheimer [389]. Il possède effectivement de nombreux effets bénéfiques (antioxydant, anti-inflammatoire, antihyperphosphorylation de la protéine Tau et anti-amyloïde). Cependant, sa faible solubilité dans l'eau et, par conséquent, sa faible biodisponibilité systémique réduisent son efficacité et ses actions thérapeutiques telles qu'observées lors des études cliniques. C'est pourquoi, l'amélioration de sa biodisponibilité lors de son administration par voie orale représente un défi majeur. De nombreuses méthodes ont déjà été développées incluant l'utilisation :

- d'adjuvants tels que la pipérine afin de bloquer son métabolisme [433];
- d'analogues structuraux de curcumin [437];
- de dispersion solide avec du polyvinylpyrrolidone (conjugés formant des micelles)
   [446];
- de systèmes de microencapsulation pour transport de médicaments (selfmicroemulsifying drug delivery systems ou SMEDDS) [447];
- de nanodisques de curcumin (bicouche phospholipidique en forme de disque dont la surface est stabilisée par des apolipoprotéines) [448];
- de complexes phospholipidiques [449];
- de liposomes [450];
- de nanoparticules polymériques et biodégradables composées de poly(lactide-coglycolide) (PLGA) [451], sur lesquelles portent cette thèse.

# 1.3 Utilisation des nanoparticules comme outil dans le traitement de la maladie d'Alzheimer

#### 1.3.1 Généralités

Comme décrit dans le chapitre 1.1.7, les traitements actuels sont limités à cause des barrières biologiques réduisant leur biodisponibilité. Au cours des dix dernières années, un intérêt considérable a été porté sur le développement de **nanoparticules** à des fins thérapeutiques pour le traitement des maladies neurodégénératives tel que la maladie d'Alzheimer. En effet, les nanoparticules sont considérées comme l'une des principales technologies du 21<sup>e</sup> siècle qui pourrait révolutionner le domaine médical.

Le terme « nano » provient du grec « nain ». Ainsi, la **nanotechnologie** correspond à l'ensemble des techniques qui permettent de fabriquer ou de synthétiser de la matière de l'ordre du nanomètre. Plus précisément, une nanoparticule est composée d'un ensemble d'atomes ou de molécules formant une structure tridimensionnelle à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire ayant un diamètre compris entre 1-1000 nm. À titre d'illustration, la taille des nanoparticules est comprise entre celles de l'ADN et d'un virus (Figure 11) [452].



Figure 11 Échelle de taille des nanoparticules en comparaison avec les principales structures de l'organisme

Grâce à leurs caractéristiques physicochimiques (taille, rapport surface/volume, stabilité dans les milieux biologiques, faible toxicité), les nanoparticules sont d'excellents outils pour l'administration de composés bioactifs. Nous avons vu précédemment que l'arrêt des médicaments par les patients atteints de la maladie d'Alzheimer est causé par leurs nombreux effets secondaires et leurs prises répétées. Il a été suggéré que leur encapsulation dans des nanoparticules permettrait non seulement de protéger les agents thérapeutiques de leur dégradation, mais aussi le contrôle spatiotemporel de leur libération, permettant ainsi leur guidage spécifique vers les régions pathologiques, par exemple, le cortex et l'hippocampe dans le cas de la maladie d'Alzheimer. En effet, les nanoparticules en tant que système de libération prolongée élevée peuvent réduire la dose et la fréquence d'administration du traitement et d'obtenir un meilleur respect des prises par le patient.

Considérant les propriétés des nanoparticules l'encapsulation de médicaments (ou des composés bioactifs) serait une stratégie efficace pour surmonter plusieurs défis dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Cependant, de nombreuses étapes doivent être franchies avant la consommation des nanoparticules par l'homme.

En effet, la mise en place d'outils de types nanoparticules à des fins biomédicales nécessite la maitrise et la compréhension de leurs différents aspects biochimiques, physico-chimiques, biopharmaceutiques et pharmacologiques. Bien que nous nous soyons intéressés au cours de ce travail de thèse principalement à l'administration orale des nanoparticules, nous allons aussi citer les résultats d'autres modes d'administration des nanoparticules, ceci dans le souci d'élargir la vision des différents modes d'administration actuels proposés dans la littérature.

Indépendamment du mode d'administration et du type de nanoparticules, leurs propriétés idéales pour qu'elles puissent transporter des composés bioactifs vers le cerveau sont les suivantes :

- Être non toxiques.
- Biodégradables et biocompatibles.
- Avoir un diamètre inférieur ou égal à 200 nm de sorte que les nanoparticules s'internalisent par endocytose dans les cellules [453, 454].
- Protéger le principe actif contre la dégradation prématurée dans le sang permettant ainsi d'augmenter le temps de circulation dans celui-ci.

- Traverser le tractus gastro-intestinal.
- Traverser la barrière hémato-encéphalique par endocytose/transcytose.
- Permettre la libération des composés dans le cerveau.
- Être capable d'encapsuler des quantités suffisantes du composé bioactif
- Relarguer des composés encapsulés.

À ce jour, un nombre considérable de systèmes de transports de composés bioactifs sous forme de nanoparticules ont été développés. Ces nanoparticules diffèrent principalement par les matériaux qui les composent (organiques, inorganiques, polymériques, lipidiques, etc.) et par les techniques de synthèse utilisées. Parmi ces systèmes de transport, nous pouvons citer les liposomes, les micelles, les nanosphères, les nanocapsules, les nanotubes de carbones, les dendrimères et les nanoparticules polymériques. Il existe deux types de nanoparticules polymériques : les naturelles (peptides, protéines, polysaccarides, etc.) [455-457] et les Poly(lactic-acide), synthétiques (Poly(D,L-lactide), poly(lactide-co-glycolide), Poly(alkylcyanocrylate) [458, 459] etc.). Les nanoparticules citées précédemment sont principalement biodégradables, biocompatibles et peu toxiques. Elles ont donc une place de choix dans le développement de systèmes de transport de composés bioactifs (ou agents thérapeutiques). Par conséquent, dans la suite de la thèse, nous allons principalement nous focaliser sur les nanoparticules polymériques et biodégradables comme transporteur de molécules actives.

À ce jour, trois types de vecteurs ont été développés, les nanoparticules de première, deuxième et troisième génération. La première génération de nanoparticules est composée de polymère tel que le PLGA, ces nanoparticules sont « nues » et par conséquent rapidement phagocytées par les macrophages du sang (chapitre 1.3.2.4.1). Ainsi, les nanoparticules de deuxième génération ont été mise en place afin d'augmenter le temps de demi-vie dans le sang [460]. Elles possèdent une surface modifiée par des polymères hydrophiles comme le polyéthylène glycol (PEG) ou par des surfactants contenant du PEG tel que le polysorbate 80. Enfin, la troisième génération possède des ligands accrochés à l'extrémité des chaines de PEG qui peuvent cibler spécifiquement une zone au niveau du cerveau, leur permettant de pouvoir ainsi traverser la barrière-hémato-encéphalique [461, 462].

Bien que les nanoparticules de première génération sont rapidement éliminées et par conséquent ne peuvent pas traverser la barrière-hémato-encéphalique, nous allons dans cette thèse tout de même, nous intéresser particulièrement à cette génération afin d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués.

#### 1.3.2 Les nanoparticules polymériques et biodégradables

#### 1.3.2.1 Les polymères biodégradables et biocompatibles

Un composé **biodégradable** (naturel ou synthétique) est un composé dégradé *in vivo* par des réactions enzymatiques ou non-enzymatiques produisant des sous-produits de dégradation qui sont biocompatibles, non-toxiques et éliminés par les voies métaboliques, mais essentiellement par les reins [463-466]

La biocompatibilité est un paramètre très important. Elle correspond à la capacité d'un matériel à remplir une fonction spécifique sans induire de réponses ou sa dégradation par l'hôte. La biocompatibilité ne dépend pas uniquement du composé, mais dépend également de l'environnement biologique et des interactions entre le polymère, le composé et les tissus biologiques [467]. Dans certains cas, l'utilisation des nanoparticules synthétiques pourrait être plus avantageuse, car celle-ci permettrait un meilleur maintien du relargage de l'agent thérapeutique encapsulé à long terme (de plusieurs jours à plusieurs semaines), alors que les nanoparticules naturelles auraient un temps de relargage beaucoup plus court et seraient dégradées plus rapidement par les enzymes digestives [468]. Parmi les polymères existants, les plus utilisés pour la synthèse de ces nanoparticules sont :

- Les polymères naturelles : albumines, gélatines, alginates, collagènes, chitosanes.
- Les polymères synthétiques : poly(D,L-Lactide ), poly(latic-acid) (PLA), poly(D,L-glycolide) (PLG), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), poly(cyanocrylate) (PCA), poly(e-Caproactone) (PCL) et poly(alkycyanocrylates) (PACA), Polybutyl(cyanocrylat) (PBCA) [469].

De nombreuses publications portant sur les nanoparticules composées des polymères PLA et PLGA ont été rapportées [470]. En effet, il a été prouvé, en particulier, que ces deux types de nanoparticules sont biocompatibles, biodégradables, faiblement toxiques et éliminées par les voies métaboliques normales [463, 467], ce qui leur procure un véritable intérêt dans des

applications thérapeutiques. Par ailleurs, ces deux polymères ont été approuvés par la « US Food and Drug Administration for Human Therapy » (FDA).

#### 1.3.2.2 Acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA)

#### 1.3.2.2.1 Le PLGA - un composé biocompatible et biodégradable

Le PLGA est un copolymère composé d'acide poly-lactique (PLA) et d'acide polyglycolique (PGA) (Figure 12).



#### Figure 12 Structure de l'acide poly(lactique-co-glycolique).

(X= nombre d'unités d'acide lactique et Y=nombre d'unités d'acide glycolique)

Parmi tous les polymères biodégradables et biocompatibles, le PLGA est le polymère le plus populaire, car il a été très largement utilisé en clinique [471]. En effet, il est utilisé depuis des années dans le domaine biomédical (fils de suture, matériaux chirurgicaux et certaines prothèses) [471, 472]. De plus, ce polymère est particulièrement intéressant, car il est utilisé en France depuis 2010 dans la fabrication de microsphères qui sont administrées par voie parentérale dans le traitement du cancer de la prostate hormono-dépendant (Décapeptyl® L. P. 22,5 mg) et de certains cancers de l'utérus [473, 474]. Ce traitement a été commercialisé par les laboratoires Ipsen et Debiopharm. Ce traitement est implanté pour 1 à 3 mois par voie intramusculaire ou sous-cutanée ce qui permet de maintenir une action prolongée durant cette période. Par ailleurs, les propriétés physico-chimiques du PLGA dépendent de son poids moléculaire et du rapport acide lactique/acide glycolique [475-477]. Cependant, ses interactions composés-polymères sont encore peu connues.

#### 1.3.2.2.2 Hydrolyses des nanoparticules de PLGA

Son hydrolyse au niveau des liaisons ester aboutit à la formation de deux monomères : l'acide lactique et l'acide glycolique [478, 479] (Figure 13).



#### Figure 13 Hydrolyse du PLGA.

Le PLGA est hydrolysé dans les milieux acides en acide lactique et en acide glycolique (Modifié d'après Kumari 2010, colloids and surfaces B: biointerfaces).

L'acide lactique formé entre dans le cycle de Krebs où il va être métabolisé en CO<sub>2</sub> et  $H_2O$  qui vont ensuite être éliminés par les voies naturelles de l'organisme [480]. L'acide glycolique entre soit dans le cycle de Krebs où il va être métabolisé et éliminé, soit il subit directement l'élimination rénale [464-466]. Par ailleurs, la libération du composé encapsulé peut se faire par sa diffusion à travers la particule vers le milieu extérieur et aussi par dégradation et/ou par érosion de la matrice polymérique jusqu'à ce qu'elle soit totalement hydrolysée [478, 479]. En effet, la quantité de principes actifs encapsulés va créer un gradient de concentration qui va induire sa diffusion vers l'extérieur.

La cinétique de relargage du composé encapsulé dans les nanoparticules polymériques varie selon le composé encapsulé et peut avoir un profil **bi-phasique**. Avec une première phase de **relargage exponentielle** correspondant à la libération du composé adsorbé à la surface des nanoparticules. Cette phase dépend principalement de la quantité de composés encapsulés et de l'hydrophobicité du polymère. En effet, une molécule hydrophobe pourra diffuser à travers la matrice polymérique hydrophobe alors qu'une molécule hydrophile pourra passer par les pores aqueux ou les microdomaines les plus hydrophiles de la matrice [481]. La seconde phase est **une phase de relargage plus lente,** correspondant à la diffusion progressive du composé encapsulé.

Cette phase dépend de la dégradation de la matrice par hydrolyse [478, 479, 482]. La dégradation du polymère varie de plusieurs mois à plusieurs années et dépend de nombreux facteurs tels que [483] :

- La composition du polymère : ce facteur est le plus important. Il influence la dégradation de la matrice des nanoparticules [484]. En effet, le PLA (contient plus de groupement méthyl) est plus hydrophobe que le PGA, donc plus la quantité de PGA est élevée, plus le polymère va être hydrophile et facilement hydrolysable, ce qui va par conséquent influencer le relargage du composé encapsulé.
- Le poids moléculaire du polymère : le poids du polymère est directement lié à la longueur de la chaîne carbonée. En effet, une longue chaîne carbonée requiert plus de temps pour être dégradée. Donc plus le poids moléculaire du polymère est élevé, plus sa dégradation est lente [485].
- Le type de composé encapsulé : de nombreuses études ont montré que la structure et les propriétés chimiques (nombre de groupement OH et hydrophobicité) du composé encapsulé modifient le profil de relargage à travers la matrice polymérique [486].
- La taille et la forme de la matrice : le taux surface/volume influence également la dégradation du polymère. En effet, plus la surface est élevée, plus la dégradation du polymère est importante. Ainsi, lorsque la surface est supérieure au volume, la vitesse de relargage du composé encapsulé est supérieure [487].
- Le **pH** : des études *in vitro* ont montré que le PLGA est hydrolysé plus rapidement dans les milieux alcalins et fortement acides [488-490].
- Le **pourcentage d'encapsulation** : il a été suggéré que, plus la quantité de composés encapsulés est élevée, plus la première phase de relargage initiale est rapide [491].

1.3.2.2.3 Différentes techniques de préparation des nanoparticules polymériques biodégradables

Il existe différentes méthodes de préparation des nanoparticules polymériques et biodégradables qui conduisent à des structures organisationnelles différentes de nanoparticules (Figure 15). Les nanoparticules sont préparées suivant deux méthodes : 1) la polymérisation de monomères; et 2) la dispersion de polymères préformés (Figure 14).

La première méthode possède un inconvénient majeur : le « *cross-linkage* ». En effet, lors de l'ajout d'un principe actif pendant la polymérisation, un croisement entre le principe actif et le polymère peut survenir, provoquant son inactivité. La seconde technique est donc plus avantageuse.



Figure 14 Diagramme représentant les quelques techniques de préparation de nanoparticules à partir de polymères préformés.

- Émulsion-diffusion : le polymère est dissout dans la phase organique contenant des solvants organiques partiellement miscibles dans l'eau (l'alcool de benzyle, le propylène et le carbone éthyle acétate). La phase organique est ensuite émulsifiée dans une solution aqueuse contenant un surfactant (SDS, PVA, DMAB). Ces étapes sont réalisées sous agitation. La taille des nanoparticules est influencée par les paramètres suivants : le solvant et la vitesse d'agitation (plus la vitesse d'agitation est rapide, plus la taille des nanoparticules sera petite) [492].

- *Salting-out* : le polymère est dissout dans la phase organique contenant de l'acétone comme solvant, miscible dans l'eau. La phase organique est ensuite émulsifiée dans la phase aqueuse au moyen d'une agitation rapide. La phase aqueuse contient l'émulsifiant et une forte concentration de sels non-solubles dans la phase organique. L'ajout d'eau combiné à une agitation moyenne réduit les liaisons ioniques et induit la migration du solvant organique soluble dans la phase aqueuse, ce qui va permettre la formation des nanosphères. La dernière étape est la purification ou une centrifugation pour éliminer les sels [493].

- Nanoprécipitation (émulsion spontanée) : le polymère et le principe actif sont dissouts dans un solvant miscible dans l'eau comme l'acétone ou le méthanol. La solution est ensuite versée goutte à goutte dans la solution aqueuse contenant le surfactant. Les nanoparticules se forment instantanément par diffusion rapide du solvant. Le solvant est éliminé par évaporation [494].

- <u>Technique d'émulsion-évaporation de solvant</u>: cette méthode comporte deux techniques qui diffèrent en fonction du composé à encapsuler. L'émulsion simple (oil (O)/water (W)) permet d'encapsuler des composés hydrophobes et l'émulsion double (W/O/W) des composés hydrophiles [458, 469, 495]. Celle-ci est basée sur l'émulsion d'une solution organique contenant le polymère et l'agent thérapeutique dans une solution aqueuse, suivi par l'évaporation du solvant organique. La réduction de la taille se fait par sonication ou homogénéisation.

Ainsi, le choix de la méthode d'encapsulation va dépendre de la solubilisation de la molécule dans les solvants utilisés en fonction de la méthode de préparation. Par exemple, la méthode d'émulsion-évaporation de solvant est la technique la plus utilisée pour l'encapsulation de composés hydrophobes et hydrophiles. De plus, cette technique est la plus ancienne et est fortement reproductible.

Tableau 1-6 Comparaison des principales méthodes de préparation des nanoparticules biodégradables à partir de polymères préformés

	Méthodes					
Caractéristiques	Émulsion-diffusion	Salting-out	Nano-précipitation	Émulsion- évaporation		
Solvant	Faible toxicité	Faible toxicité	Faible toxicité	Faible toxicité		
Consommation d'énergie	Faible	Faible	Faible	Moyenne		
Eau utilisée	Élevée	Moyen	Élevée	Faible		
Concentration du polymère	Relation de proportionnalité à la taille des nanoparticules	Moyen-élevée	Faible pour que ça n'affecte pas la taille des nanoparticules	<i>Moyenne-élevée n'influence pas la taille des particules</i>		
Antioxydants hydrophobes	Forte encapsulation	Forte encapsulation	Forte encapsulation	Forte encapsulation		
Antioxydants hydrophiles	Faible encapsulation	Faible encapsulation	Moyenne encapsulation	Bonne encapsulation (double émulsion)		
Contrôles de la taille	Recommandés	Recommandés	Recommandés	Recommandés		
Temps de synthèse	Moyen-élevé	Moyen	Élevé	Faible		
Purification	Moyenne	Élevée	Élevée	Moyenne		

Ensuite, la forme des nanoparticules la plus adaptée est choisie en fonction de la molécule à encapsuler. En effet, en fonction de la solubilité du composé, il pourra soit être

encapsulé dans le cœur aqueux ou huileux des nanoparticules pour former des **nanocapsules**, soit être encapsulé dans le cœur hydrophobe et/ou adsorbé à la surface des nanoparticules pour former des **nanosphères** (Figure 14).



#### Figure 15 Type de nanoparticules biodégradables.

Les nanoparticules sont divisées en deux classes en fonction de leur structure : nanosphère et nanocapsule. L'agent thérapeutique sera soit encapsulé dans les nanocapsules soit encapsulé et/ou adsorbé à la surface des nanophères.

#### 1.3.2.2.4 Internalisation cellulaire des nanoparticules de PLGA

À ce jour, les mécanismes d'internalisation cellulaire des nanoparticules de PLGA ne sont pas complètement élucidés. Cependant, c'est l'un de leurs principaux avantages même si cela n'est pas généralisable à toutes les nanoparticules. Nous pouvons émettre deux différentes hypothèses quant au devenir des nanoparticules au contact des cellules : soit que les nanoparticules libèrent le principe actif tout près de la membrane plasmique et facilitent la diffusion de celui-ci, soit qu'elles sont internalisées et relarguent leur contenu dans le cytosol. D'après la première hypothèse, il est possible que les nanoparticules restent proches ou qu'elles adhèrent à la membrane et qu'elle relargue son contenu tout près de la membrane plasmique. Dans ce cas, le principe actif s'internaliserait plus facilement par diffusion passive puisque le principe actif serait transporté tout près du lieu d'absorption. La seconde hypothèse est l'internalisation par endocytose. Il a en effet était suggéré que les nanoparticules de PLGA sont internalisées par les cellules musculaires lisses vasculaires en partie par pinocytose des fluides se trouvant à l'extérieur de la cellule et aussi par endocytose médiée par la clathrine [496]. Ensuite, les nanoparticules de PLGA quittent rapidement l'endo-lysosome et entrent dans le cytoplasme (dans les dix minutes qui suivent l'incubation) où le composé encapsulé est libéré pour être redirigé vers les organites cellulaires (mitochondrie, noyau, etc.) [497, 498].



Figure 16 Représentation schématique de l'internalisation cellulaire d'agents thérapeutiques encapsulés dans des nanoparticules polymériques et biodégradables de PLGA.

(1,2) Internalisation des nanoparticules par endocytose; (3) relargage de l'agent thérapeutique dans le cytoplasme;
(4) ciblage des nanoparticules vers le noyau et la mitochondrie; (5) exocytose des nanoparticules ; Cur =Curcumin libéré par les nanoparticules.

Un élément important qui peut influencer l'internalisation cellulaire des nanoparticules est leur charge et la structure surfacique. Il semblerait que les nanoparticules chargées positivement auraient une meilleure internalisation grâce aux interactions ioniques entre les nanoparticules et la cellule (chargée négativement) [499, 500]. De plus, il a été montré que les nanoparticules chargées positivement sont capables d'échapper aux lysosomes après leur internalisation et se trouvent rapidement au niveau périnucléaire [501]. Ainsi, pour augmenter l'internalisation cellulaire la surface des nanoparticules de PLGA peut-être modifiée par l'ajout d'une chaine PEG (hydrophyle et non-ionisé) protégeant ainsi les nanoparticules du réticulum endothéliale [502].

#### 1.3.2.3 Propriétés physico-chimiques des nanoparticules

La charge surfacique est un paramètre indispensable à considérer lors de la formulation de nanoparticules. La mesure du **potentiel Zeta** est la méthode qui permet de déterminer la charge globale des nanoparticules acquise dans un milieu particulier. Ce paramètre nous informe sur les forces répulsives présentes entre les particules et influence directement leur stabilité en suspension [458, 469]. L'augmentation de la valeur absolue du potentiel Zeta est liée à l'augmentation des forces répulsives entre les particules et, par conséquent, à l'augmentation de la stabilité des nanoparticules. Une formulation est considérée stable si le potentiel électrique entre les particules est supérieur à  $\pm$  30 mV [503].

La taille des nanoparticules est également un paramètre important à vérifier lors de la préparation des nanoparticules. La taille moyenne et l'indice de polydispersité (distribution de taille d'une population de particules) sont déterminés par spectroscopie de corrélation photonique (ou par *diffusion dynamique de la lumière* (DLS)). Cette technique se base sur la diffusion de la lumière causée par le mouvement Brownien des particules [504]. La microscopie électronique est généralement utilisée afin de confirmer les résultats obtenus en DLS mais fournit également des informations concernant la morphologie des nanoparticules.

#### 1.3.2.4 Les principales barrières biologiques

Une fois l'agent thérapeutique encapsulé dans les nanoparticules, il doit être acheminé jusqu'à son site d'action. Cette étape est compliquée, car les nanoparticules doivent faire face aux nombreuses barrières biologiques : les **barrières externes** (peau et muqueuse) et les **barrières internes** (sanguine, gastro-intestinale et hémato-encéphalique). Certaines de ces barrières sont facilement contournables via le mode d'administration (intraveineux, nasal ou oral). Donc, la taille et les propriétés physicochimiques des nanoparticules vont principalement influencer leur passage au niveau des barrières internes.

#### 1.3.2.4.1 La barrière sanguine

Les protéines sanguines spécifiques sont susceptibles de s'adsorber sur des particules ayant des surfaces hydrophobes menant à la reconnaissance et la capture de celles-ci par le système phagocytaire, c'est le mécanisme d'ospsonisation. En effet, les nanoparticules de **taille supérieure à 10 nm** interagissent avec les opsonines (protéines plasmatiques qui se fixent par adsorption à la surface d'un corps étranger). Le complexe est ensuite transporté jusqu'au foie où il va facilement être capté et phagocyté par les **cellules de Küpffer** (cellules d'origine macrophagique) et par d'autres cellules du système phagocytaire mononuclé [505]. Afin de pallier à cet inconvénient, il existe deux possibilités, la première consiste à préparer des nanoparticules de **sette taille** (inférieure à 10 nm) qui ont échappé à l'opsonisation et qui sont rapidement éliminées du sang par voie rénale. L'élimination rénale est spécifique des particules d'environ 10 nm et d'une masse molaire de 48 kDa [506, 507]. Or, ces nanoparticules ne peuvent pas transporter une quantité suffisante de principes actifs ainsi, cette option est peu utilisée. La deuxième possibilité est de modifier la surface des nanoparticules hydrophobes en recouvrant la surface par un polymère hydrophile (PEG) ou par un surfactant contenant du PEG (Polysorbate 80) afin de conférer une protection stérique et limiter l'opsonisation.

Parmi les polymères utilisés pour leurs propriétés de surface, et ayant fait l'objet de nombreuses études, on cite, le PEG. Ce dernier est un polyéther hydrophile, non ionique, non toxique et biodégradable [508, 509]. Le polyéthylène glycol linéaire a été introduit dans les années 90, dans la composition des liposomes et des nanoparticules polymériques. Il est surtout utilisé comme polymère de couronne de nanoparticule à cœur hydrophobe [510, 511]. Le PEG a la propriété de diminuer les interactions entre les protéines et la surface des nanovecteurs, de modifier la pharmacocinétique, la biodistribution et d'influencer l'internalisation des nanovecteurs par les cellules [461, 512]. Les chaines de PEG de taille allant au-delà de 2 kDa peuvent réduire considérablement l'adsorption d'opsonines et d'autres protéines du sérum sur les nanovecteurs.

De plus, contrairement aux nanoparticules de petite taille, la présence de PEG permet d'augmenter la taille des nanoparticules ce qui permet le transport d'une quantité plus importante de composés bioactifs. Par ailleurs, sa présence en surface favorise également l'endocytose cellulaire et permet aussi une mucoadhésion ce qui augmente le temps de séjour du vecteur à l'intérieur de l'organisme [85]. Il est cependant, important de noter que la taille des nanoparticules doit être limitée pour différentes raisons physiologiques. Dans les applications liées au cancer, la taille des nanoparticules doit être inférieure à 200 nm car les particules ayant une taille supérieure ne passent pas à travers les pores créés dans les endothéliums tumoraux.

Ainsi, après l'administration par voie intraveineuse les nanoparticules de première génération « nues » sont rapidement phagocytés et par conséquent ne pourront pas traverser la barrière-hémato-encéphalique.

## 1.3.2.4.2 Absorption au niveau de la barrière gastro-intestinale des nanoparticules polymériques biodégradables

L'intérêt porté aux nanoparticules depuis ces dix dernières années a amené à l'augmentation des études portant sur leur absorption par le tractus gastro-intestinal [513] qui est la principale limitation lors de leur administration par voie orale.

Les principaux paramètres influençant le passage des nanoparticules par le tractus gastrointestinal sont la taille, la charge surfacique, la composition du polymère et l'hydrophobicité. Il est important de souligner que la traversée du tractus gastro-intestinal par les nanoparticules est un véritable défi, car il est formé de la bouche, du pharynx, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle, du colon et des organes annexes (glandes salivaires, foie, vésicule biliaire et pancréas). Il est également tapissé d'une monocouche de cellules épithéliales et de cellules M qui forment une véritable barrière-biologique aux corps étrangers. Il existe également des nodules lymphoïdes répandus le long de la paroi de l'intestin formant les **plaques de Peyer** [514] par où les nanoparticules < 100 nm pourraient traverser le mucus [515]. De plus, la surface de l'épithélium comprend des espaces intercellulaires qui sont fermés par des jonctions serrées (zonula, macula, desmosone) d'un diamètre compris entre 0,1  $\mu$ m et 0,5  $\mu$ m ce qui permettrait aux nanoparticules de petite taille de passer à travers ces espaces.

Le passage des nanoparticules à travers le tractus gastro-intestinal a été très largement étudié sur différents modèles *in vivo* et *in vitro* [516-518]. Les cellules Caco 2 sont les principaux modèles *in vitro* utilisés pour l'étude de l'absorption gastro-intestinale des nanoparticules [519, 520]. Il est important de noter que l'absorption des nanoparticules varie en fonction de l'espèce animale étudiée (rat, souris, cochon et lapin etc.). Cela proviendrait principalement de la quantité variable de plaques de Payer inter-espèce [518, 521-523]. De plus, la complexité et la longueur du tractus gastro-intestinal rendent difficiles la quantification et la localisation des nanoparticules.

L'absorption des nanoparticules de PLGA dépend principalement de la taille de ces dernières. En effet, des études réalisées sur des modèles animaux (intestin de rats et de souris) et cellulaires (Caco 2) suggèrent que les nanoparticules de 100 nm sont mieux absorbées au niveau des plaques de Payer et des entérocytes que les petites (1-10 nm) [520, 524-526]. Ainsi, lors de l'administration par voie orale, les nanoparticules permettraient principalement de protéger les composés bioactifs de la dégradation au niveau du tractus digestif, d'augmenter la solubilité apparente du principe actif et d'être absorbées au niveau des plaques de Peyer. Dans ce cas les nanoparticules de première génération peuvent traverser la barrière gastro-intestinale, mais seront opsonisées dans le sang par les macrophages du foie et ne pourront donc pas passer la barrière-hémato-encéphalique. Ainsi, seules les molécules actives hydrophobes libérées par les nanoparticules dans le sang où elles pourront se fixer aux protéines et lipoprotéines sériques (tels que l'albumine, le fibrinogène, l'immunoglobuline G et la transferrine) seront capables de traverser la barrière-hémato-encéphalique [527].

## 1.3.2.4.3 Passage des nanoparticules polymériques biodégradables à travers la barrière-hématoencéphalique

La barrière-hémato-encéphalique est composée de cellules endothéliales, de péricytes, d'astrocytes et d'une membrane basale [528]. Contrairement aux capillaires périphériques, les capillaires du système nerveux central ne possèdent pas de fenestrations et ont une faible activité de pinocytose limitant ainsi le passage trans-cellulaire des molécules. De plus, la barrièrehémato-encéphalique est caractérisée par la présence de jonctions serrées qui induit une forte restriction endothéliale [528]. Par ailleurs, les projections astrocytaires recouvrent les cellules endothéliales de la barrière-hémato-encéphalique en leur fournissant un support biochimique et nutritif. Cette barrière possède donc son propre mécanisme de défense protégeant le cerveau contre toutes formes d'éléments dommageables et de microorganismes. Cependant, elle est un véritable obstacle pour l'administration de médicament ciblant le cerveau, ce qui est l'une des principales limitations pour le traitement de maladies neurodégénératives.

Pour qu'un agent thérapeutique puisse traverser la barrière-hémato-encéphalique par diffusion, il doit être non-ionisé à pH physiologique, lipophile et de faible poids moléculaire < 400 Da [529]. Ainsi, pour surmonter les limites induites par la barrière-hémato-encéphalique, de nombreuses techniques ont été développées telles que l'utilisation d'agents biologiques, de liposomes et de nanoparticules. Cependant, les nanoparticules doivent répondre à certains critères (taille et surface) afin d'être utilisées en tant qu'outil efficace de transport de composés bioactifs à travers la barrière-hémato-encéphalique [528, 530]. C'est pourquoi les nanoparticules de troisième génération ont été développées. Ils sont capables de traverser la barrière-hémato-encéphalique grâce à un ligand fixé sur la chaine de PEG et ciblant spécifiquement des récepteurs qui se trouvent à la surface des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique.

Ainsi, ce type de nanoparticules polymériques et biodégradables sont des candidates prometteuses pour l'acheminement de composés thérapeutiques vers le cerveau. Cependant, les mécanismes exacts de transport des nanoparticules à travers la barrière-hémato-encéphalique ne sont pas encore élucidés.

# 1.3.2.5 Les nanoparticules polymériques biodégradables développées pour le traitement dans la maladie d'Alzheimer

L'effet thérapeutique des nanoparticules dans la maladie d'Alzheimer a été considérablement étudié au cours des dernières années [25, 529-531]. Nous avons récemment résumé ces études dans la revue [529] (Annexe 3). Dans cette thèse, seules quelques études seront détaillées.

Tel que décrit précédemment, les **traitements anticholinestérases** possèdent de nombreux effets négatifs causés par leurs actions périphériques. Un moyen de réduire ces effets est de les encapsuler dans des nanoparticules. Par exemple, la **tacrine** a été encapsulée avec succès dans deux types de nanoparticules polymériques et biodégradables formés soit de chitosan (avec une taille de  $41 \pm 7$ nm) [532] ou de PBCA (avec une taille  $35 \pm 4,64$  nm) [533]. Elles ont été préparées par émulsion de solvant avec différents ratios de concentration polymère-traitement

en fonction du pourcentage d'encapsulation. De plus, pour faciliter leur passage à travers la barrière-hémato-encéphalique, ces nanoparticules ont été recouvertes de 1 % de polysorbate 80. Les études de bio-distribution ont été réalisées chez le rat et ont montré qu'une heure après l'administration en i.v des nanoparticules, la tacrine est retrouvée dans le foie, la rate, les reins, les poumons, le cœur et que la concentration cérébrale de la tacrine encapsulée est supérieure à celle de la tacrine libre [533].

La **rivastigmine** a également été encapsulée dans des nanoparticules de PBCA recouvertent de 1 % de polysorbate (d'une taille de 40 nm  $\pm$  6,9 nm) [533] par la technique d'émulsion de solvant. Ces nanoparticules ont été administrées à des rats par i.v. et la concentration cérébrale de rivastigmine obtenue est 3,82 fois supérieure que celle de la rivastigmine seule [533].

La thioflavine T est un composé fluorescent très largement utilisé pour le marquage des plaques séniles. Cependant, ce composé est chargé et hydrophile, il est donc incapable de traverser la barrière-hémato-encéphalique. Son encapsulation dans des nanoparticules composées d'un cœur de polystyrène et d'une surface de PBCA a permis d'augmenter significativement sa fluorescence par rapport à la thioflavine T. De plus, son administration intracérébrale à des souris transgéniques mutées (APPswe/PS1 dE9) suggère que la thioflavine T se fixe spécifiquement sur les fibrilles d'Aß et réduit les dépôts d'Aß. Ces résultats soutiennent donc l'idée que les nanoparticules pourraient avoir un double effet de marquage et de protection contre l'Aß [534]. La thioflavine T a également été encapsulée dans des nanoparticules ayant un cœur de latex et une surface de PBCA. Ces nanoparticules ont été injectées spécifiquement dans l'hippocampe de souris et les résultats montrent que la thioflavine T se fixe principalement dans les neurones et la microglie [535]. Dans cette étude les nanoparticules ont été administrées par injection intracérébroventriculaire, mais il a été montré qu'elles étaient également capables de traverser la barrière-hémato-encéphalique lorsqu'elles sont recouvertes de polysorbate 80 est injectées par voie i.v [536]. Ainsi, les résultats de ces études permettent de conclure que l'utilisation de nanoparticules pourrait être une solution appropriée pour le transport de composé ciblant l'accumulation d'A $\beta$  dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Comme nous l'avons vu précédemment, les polyphénols ont un fort potentiel thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer. Cependant, lorsqu'ils sont administrés par voie

orale, ils sont faiblement absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal, très fortement métabolisés et, par conséquent, rapidement éliminés. Ainsi, l'encapsulation de composés phénoliques dans des nanoparticules polymériques et biodégradables est devenue un domaine de recherche très actif. Récemment, il a été démontré que l'encapsulation des **catéchines** telles que l'épicagalocatéchine gallate (ECGC) dans des nanoparticules de chitosan augmente de manière significative son absorption au niveau du jéjunum de souris. Cependant, ces nanoparticules ne sont pas capables de traverser la barrière-hémato-encéphalique, car leur taille moyenne est de l'ordre de 432 nm [537, 538]. L'ECGC a également été encapsulée dans des nanoparticules lipidiques (nanoECGC). Ces nanoparticules ont été testées sur des cellules de neuroblastomes de souris transfectées par la forme humaine mutante de l'APP (APPswe, N2a). Les résultats obtenus suggèrent que les NanoEGCG améliorent l'activité de l' $\alpha$ -sécrétase à de très faibles concentrations (3,125  $\mu$ M). De plus, il a été montré que leur administration par voie orale à des rats augmente deux fois plus leur biodisponibilité systémique que le ECGC libre [539].

Le resvératrol a également été encapsulé dans des nanoparticules composées d'un cœur de poly-caprolactone (PLC) (hydrophobe) et d'une surface de polyethyleneglycol (PEG) (hydrophile). Ces nanoparticules ont été administrées aux cellules PC12. Les résultats obtenus indiquent qu'elles sont non-toxiques et qu'elles protègent les cellules PC12 contre la toxicité induite par l'A $\beta$  en piégeant les espèces réactives de l'oxygène [540]. Récemment, il a été montré que le resvératrol encapsulé dans des nanoparticules composées de PLC protège les neurones corticaux de rats contre le stress oxydatif et l'apoptose induits par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [541].

## 1.3.2.5.1 Utilisation des nanoparticules afin d'augmenter la biodisponibilité et l'activité du curcumin

Dans le but d'augmenter la solubilité apparente dans l'eau du curcumin et aussi sa protection contre la forte dégradation présente dans les milieux biologiques, l'utilisation des nanoparticules semble applicable. En effet, l'encapsulation du curcumin dans des nanoparticules a été très largement étudiée dans le transport de médicament ciblant le cancer. En effet, il a été montré que les nanoparticules sont internalisées dans de nombreuses cellules cancéreuses telles que dans les cellules issues d'un métastase de cancer du sein ou ovarien (Hela), d'un cancer pancréatique (BxPC3), d'un cancer de la prostate ou des cellules issues d'une leucémie chronique, etc, [542-547]. À cet égard, des études ont montré que l'encapsulation du curcumin dans des nanoparticules permet de bloquer la prolifération cellulaire, la voie NF- $\kappa$ B et de réduire l'activation des cytokines pro-inflammatoire (IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ) [543, 544, 546, 548]. Cependant, les études ciblant le transport du curcumin à travers la barrière-hémato-encéphalique afin de traiter les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer sont très limitées.

Nous avons vu précédemment que le curcumin est le polyphénol le plus prometteur dans le traitement de la maladie d'Alzheimer grâce à son activité pléiotropique. Il cible en effet de nombreuses voies impliquées dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer tel que l'inflammation, le stress oxydatif, la cascade amyloïde et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Cependant, sa faible biodisponibilité systémique, lors de son administration par voie orale, réduit considérablement son efficacité et donc le principal défi de recherche est d'augmenter sa solubilité dans les milieux aqueux. Pour cela, de nombreuses méthodes ont été développées, mais la plus efficace est son encapsulation dans des nanoparticules. En effet, de nombreuses études ont montré qu'en comparaison avec curcumin libre, son encapsulation permet d'augmenter considérablement sa dispersion et sa dissolution dans des solutions aqueuses [542-544, 548]. Par exemple, plus de 95 % du curcumin encapsulé dans les SMEDDs est dissout après 20 minutes et donne une solution claire [549]. De plus, sous cette forme, l'absorption gastro-intestinale du curcumin est significativement plus élevée lors de son administration chez la souris [549]. Une étude comparative entre l'effet de la pipérine et l'encapsulation du curcumin indique que le relargage du curcumin encapsulé dans les nanoparticules se fait de manière prolongée après 48 heures, alors que pour le curcumin libre (ou en combinaison avec la pipérine) n'est plus détectable après 6 heures. Il est intéressant de noter que la pipérine augmente la biodisponibilité du curcumin libre de trois fois, alors que les nanoparticules l'augmentent de neuf fois [451]. De plus, le profil de relargage du curcumin par les nanoparticules est composé d'une réponse rapide pendant les premières 24 heures, suivie d'un relargage plus lent pendant 20 jours [451, 543] [543, 544, 549]. Il a été montré qu'après quatre heures de l'administration en i.v. de curcumin encapsulé dans des nanoparticules de PLGA-PEG-PLGA (d'une taille de 50 nm) à des souris, le curcumin se retrouve dans le cerveau avec une concentration 6,28 fois supérieure à celle du curcumin libre [550]. En accord avec l'étude précédente, le curcumin encapsulé dans des nanoparticules de PBCA recouvertes de polysorbate 80 est capable également de traverser la

barrière-hémato-encéphalique et augmente de 2,5 fois la concentration de curcumin dans le cerveau par rapport au curcumin libre après administration en i.v. [551]. Plus précisément, il a été montré que l'administration de curcumin encapsulé dans des nanoparticules de PLGA en i.v chez le rat prolonge le temps de demi-vie du curcumin dans le cerveau de 2,8 fois et augmente davantage le temps de séjour du curcumin dans l'hippocampe de 2 fois et dans le cortex de 1,8 fois [552]. En effet, le curcumin est très rapidement éliminé de l'organisme du fait de sa faible biodisponibilité dans l'organisme qui pourrait être causée par sa rapide élimination systémique. Ainsi, l'utilisation de nanoparticules permet au curcumin de rester plus longtemps dans le cerveau et particulièrement au niveau du cortex et de l'hippocampe. Certaines études suggèrent donc qu'après administration intraveineuse de curcumin encapsulé dans des nanoparticules polymériques et biodégradables recouvertes de polysorbate 80, PEG et/ou d'autres ligands, augmente clairement la distribution cérébrale du curcumin. Cependant, leurs mécanismes de transport à travers la barrière-hémato-encéphalique sont encore peu connus. Il est connu que la fixation d'un ligand tel que l'ApoE sur la chaine PEGylé permet leur transport à travers la barrière-hémato-encéphalique [26]. Plus spécifiquement, un intérêt a été porté sur l'ApoE car elle peut entrer dans le liquide céphalorachidien en traversant le plexus choroïde pour se retrouver dans le cerveau par endocytose des récepteurs au LDL (LDL-R) [553, 554]. L'administration de nanoparticules de curcumin encapsulé dans des nanoparticules de PBCA couplés à l'ApoE3 protège les cellules SH-SY5Y de la toxicité induite par l'Aß en réduisant le niveau des espèces réactives de l'oxygène [555]. En accord avec l'étude précédente, il a été montré que le traitement des cellules SK-N-SH par des nanoparticules polymériques (NanoCurc<sup>™</sup>) consituées des momonéres de N-isopropylacrylamide, vinylpyrrolidone et d'acide d'acrylique protègent contre la toxicité induite par le H2O2 et réduit significativement la production des espèces réactives de l'oxygène. De plus, l'administration intrapéritoneal des NanoCurc<sup>TM</sup> à des souris athymiques induit l'augmentation de la concentration du GSH et la diminution de l'activité des caspases 3 et 7 dans le cerveau de ces souris [556].

En conclusion, ces résultats suggèrent que l'encapsulation du curcumin dans certains types de nanoparticules et dont le choix se fait en fonction de la voie d'administration, représente un moyen de transport adéquat, lui permettant ainsi d'agir efficacement dans le traitement la maladie d'Alzheimer.

#### 1.4 Problématique, hypothèses et objectifs de travail

La maladie d'Alzheimer touche plus de 23,4 millions d'individus à travers le monde. En considérant le vieillissement de la population, ce nombre va dramatiquement augmenter au cours des prochaines décennies, en absence de traitement plus efficace. En effet, à ce jour, il n'existe aucun traitement pouvant prévenir ou guérir cette pathologie, car les véritables causes sont encore loin d'être connues. Les patients peuvent cependant recevoir certains traitements tels que les **inhibiteurs des acétylcholinestérases** administrés lors de **symptômes légers** ou **modérés** et des **antagonistes des récepteurs MNDA** utilisés pour soulager les **symptômes modérés** ou **graves** de la maladie. Ces traitements attenuent les symptômes, mais possèdent de nombreuses limitations. En effet, ils permettent uniquement de ralentir l'apparition des symptômes sans traiter la maladie, ils induisent de nombreux effets secondaires périphériques et une faible biodisponibilité cérébrale.

Les études *post mortem* réalisées sur des cerveaux de patients atteints de cette pathologie ont permis de mettre en évidence deux types de lésions au niveau de l'hippocampe et du cortex: les **plaques séniles** composées essentiellement de l'accumulation extracellulaire d'amyloïde- $\beta$  et les **dégénérescences neurofibrillaires** constituées de l'accumulation anormale de la protéine tau hyperphosphorylée, entraînant la perte des fonctions cognitives. Il est maintenant clairement établi que le stress oxydatif *via* l'action des radicaux libres peut causer des dommages irréparables aux cellules nerveuses et entraîner leur mort. De plus, des études réalisées sur des animaux et sur des cerveaux *post mortem* de patients atteints de la maladie d'Alzheimer indiquent que le **stress oxydatif n'est pas seulement une conséquence de la maladie, mais semble également contribuer à la physiopathologie de façon précoce.** Ainsi, l'administration d'antioxydants à des patients serait donc un moyen de prévenir des dommages causés par le stress oxydatif.

Parmi les différents produits naturels antioxydants, le curcumin est l'un des composés le plus étudié. Ce polyphénol présent dans la racine du *curcuma longa*, possède un très fort pouvoir antioxydant, mais aussi anti-inflammatoire, antiprolifératif, antimicrobien, anticancérigène et neuroprotecteur. En effet, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le curcumin inhibe les dépôts d'amyloïde- $\beta$  et réduit l'hyperphosphorylation de la protéine tau.

Du fait de son caractère hydrophobe, le curcumin est mal absorbé par l'organisme lors de son administration par voie orale chez l'homme et chez l'animal, ce qui réduit son efficacité thérapeutique. Afin d'augmenter la solubilité apparente du curcumin dans l'eau et aussi sa protection contre la forte dégradation présente dans les milieux biologiques, de nombreuses stratégies ont été développées afin d'améliorer sa pharmacocinétique, sa biodisponibilité et sa solubilité dans des conditions physiologiques telles que l'utilisation de composés bloquant le métabolisme enzymatique du curcumin. Cependant, ces composés ont été rapidement négligés du fait de leur manque d'efficacité comme système de libération de médicament.

Depuis les dix dernières années, un intérêt considérable est porté sur l'utilisation de nanoparticules, composées d'une matrice polymérique biocompatible et biodégradable comme systèmes de libération de médicament dans le cerveau tel que le PLGA qui a été approuvé par la FDA. Bien qu'il a été montré que les nanoparticules de PLGA non-modifiées en surface ne traversent pas la barrière-hémato-encéphalique lors de leur administration par voie orale, l'objectif de notre travail dans un premier temps a été de valider la méthode de synthèse des nanoparticules, l'encapsulation du curcumin, analyser ses propriétés physico-chimiques, la conservation de l'intégrité du curcumin encapsulé, d'évaluer leurs toxicités et de l'efficacité du curcumin à travers des études in vitro sur une lignée cellulaire issue de neuroblastomes humains, les SK-N-SH en développant des protocoles d'études spécifiques aux nanoparticules avant de passer dans des études futures à son encapsulation dans des nanoparticules de PLGA recouvertes de PEG et de ligands spécifiques. En effet, nous avons choisi d'étudier les nanoparticules de première génération, car leur administration par voie orale permettrait le passage d'une partie à travers la barrière intestinale via les plaques de Peyer. Ces nanoparticules pourraient alors libérer une petite partie de curcumin avant d'être phagocytées par le macrophage du foie et de la rate. L'autre partie de ces nanoparticules, en augmentant la solubilité apparente et sa dégradation dans le tractus digestif, va libérer à son tour le curcumin directement dans le tube digestif ce qui augmenterait davantage son absorption intestinale et ceci grâce à l'augmentation de sa solubilité apparente et sa protection vis-à-vis du fluide digestif. À la lumière de ces données, une plus grande quantité de curcumin pourraient arriver dans le sang permettant ainsi à celui-ci et grâce à son caractère hydrophobe d'être transporté par les protéines sériques et/ou les apolipoprotéines et de franchir la barrière-hémato-encéphalique. Par conséquent, l'augmentation de l'efficacité du curcumin intracérébrale serait du à l'augmentation de sa biodisponibilité sanguine.

Ainsi en découle **l'hypothèse** suivante : l'encapsulation du curcumin par ces nanoparticules permettrait d'augmenter la stabilité, la solubilité apparente, la biodisponibilité, et la délivrance du curcumin au niveau de cellules cibles telles que les neurones ce qui permettrait de prévenir ou de retarder la dégénérescence neuronale. Dans le but de répondre à cette hypothèse nous nous sommes fixés trois objectifs:

#### Objectif 1 : Préparer et caractériser les nanoparticules vides et encapsulant du curcumin

Brièvement, pour répondre à cet objectif, nous allons préparer des nanoparticules vides de PLGA (Nps) et des nanoparticules de curcumin (Nps-Cur) par la technique d'émulsion évaporation de solvant qui est une technique fortement reproductible permettant de contrôler la taille des nanoparticules. Ensuite, nous caractériserons la formulation obtenue par diffusion dynamique de la lumière et par microscopie électronique, ces techniques nous donnent des informations sur la taille, la morphologie et l'index de polydispersité. Nous déterminerons également le pourcentage d'encapsulation du curcumin dans ces nanoparticules par HPLC et la cinétique *in vitro* de relargage par la méthode de la dialyse.

# <u>Objectif 2 : Évaluer *in vitro*, les effets toxiques ou protecteurs des nanoparticules, l'efficacité de l'encapsulation du curcumin et leur distribution cellulaire.</u>

Les études *in vitro* seront réalisées sur les cellules de neuroblastomes humains, les SK-N-SH. L'internalisation du curcumin sera déterminée par microscopie à fluorescence et confocale. À l'aide des tests de survie cellulaire et de mort cellulaire, nous déterminerons la toxicité cellulaire et l'effet protecteur des Nps-Cur synthétisées sur la mort neuronale causée par un stress oxydatif induit par le  $H_2O_2$ . De plus, nous déterminerons l'effet des Nps-Cur sur l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène ainsi que la consommation du glutathion induite par le  $H_2O_2$ . Finalement, nous démontrerons par la méthode d'imnunobuvardage de type Western l'effet des Nps-Cur sur l'induction du facteur de transcription nucléaire, Nrf2 en présence de  $H_2O_2$ . Objectif 3 : Étude de l'influence du rapport acide lactique/ acide glycolique sur le pourcentage d'encapsulation, le relargage et l'absorption cellulaire du curcumin.

En nous basant sur les résultats obtenus pour les objectifs 1 et 2, nous améliorerons certains paramètres de ces nanoparticules tels que le pourcentage d'encapsulation, le profil de relargage *in vitro* et l'absorption cellulaire du curcumin. Pour cela, nous allons étudier l'influence de la composition du polymère en changeant le ratio **d'acide lactique** et **d'acide glycolique**, en utilisant du PLGA 50:50 au lieu du PLGA 65:35. Ces nanoparticules nouvellement synthétisées vont être également caractérisées et évaluées *in vitro*. Ensuite, nous déterminerons plus particulièrement leur capacité antioxydante *via* les tests de l'ORAC et du DPPH. Enfin, leur activité biologique sera évaluée par immunobuvardage de type western sur différentes voies impliquées dans la maladie d'Alzheimer (Nrf2, Akt, NF- $\kappa$ B et GSK3).

En conclusion, notre travail représente une étape préliminaire dans l'élaboration de nanoparticules ayant pour objectif le maintien de l'activité du curcumin et cette étude permet également de comparer l'efficacité du curcumin encapsulé par rapport à celle du curcumin libre.

## 2 PUBLICATIONS

# 2.1 ARTICLE 1 : L'effet neuroprotecteur du curcumin encapsulé dans des nanoparticules de PLGA et son absorption par les cellules humaines les SK-N-SH.

#### 2.1.1 Résumé de l'article 1

Le curcumin est un polyphénol provenant de la racine du Curcuma Longa. Ce composé est particulièrement intéressant, car il possède une activité pléiotropique. En ce sens, le curcumin est un puissant antioxydant, anti-inflammatoire et anti-amyloïde. Cependant, des études in vitro et in vivo ont démontré des limites de son action thérapeutique lors de son administration par voie orale, causées principalement par sa faible solubilité en milieu aqueux. Ainsi, le but de cette étude est d'augmenter la solubilité apparente du curcumin afin d'améliorer son efficacité neuroprotectrice et son absorption par les cellules neuronales. Pour cela nous nous sommes basés sur l'utilisation de nanoparticules polymériques et biodégradables afin de transporter des agents thérapeutiques aux cellules neuronales, qui seront administrées par voie orale. Parmi les polymères biocompatibles et biodégradables, le poly lactide-co-glycolide (PLGA) semble être le meilleur candidat. Il est peu toxique et certaines de ses propriétés peuvent être ajustables, telles que la taille, le relargage du composé encapsulé et le pourcentage d'encapsulation. Ainsi, nous avons encapsulé le curcumin dans des nanoparticules composées d'une matrice polymérique formée de PLGA (Nps-Cur) par l'utilisation de la méthode d'émulsion-évaporation de solvant. Ces nanoparticules ont été ensuite caractérisées par l'étude de leur forme et leur taille par diffusion dynamique de la 1 mière (DSL) et par microscopie électronique à transmission (MET). La taille des nanoparticules obtenue (80 - 120 nm) et la mesure de l'index de polydispersité (< 0,25) suggèrent que la formulation synthétisée est homogène. Le pourcentage d'efficacité de l'encapsulation du curcumin dans ces nanoparticules déterminé par HPLC est de l'ordre de 31%. De plus, la spectroscopie à fluorescence a permis de confirmer que le curcumin est bien encapsulé dans les Nps-Cur. Le pourcentage de libération du curcumin par les Nps-Cur a été déterminé par dialyse et les mesures de la concentration de curcumin libérée dans le milieu de relargage ont été évaluées par HPLC. Il est intéressant de noter que le relargage du curcumin suit

un profil biphasique avec une phase de relargage exponentielle qui correspond à la libération du curcumin qui se trouve adsorbé ou proche de la surface externe des nanoparticules et une phase de relargage plus lente qui correspond à la libération du curcumin au centre de la particule. L'étude de la stabilité des Nps-Cur, déterminée par la mesure de la quantité de curcumin encapsulé, la forme et la taille des Nps-Cur, indique qu'elles sont stables durant au moins 6 mois.

Les études *in vitro* ont été réalisées sur des cellules de neuroblastomes humains les, SK-N-SH. L'internalisation du curcumin par ces cellules a été observée par microscopie à fluorescence et microscopie confocale *via* l'émission de l'auto-fluorescence du curcumin. La fluorescence associée au curcumin est largement détectée dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules SK-N-SH. Les tests de survie cellulaire (résazurin) et de mortalité cellulaire (libération de la lactate déshydrogénase) ont permis de démontrer que les Nps-Cur sont nontoxiques et qu'elles protègent plus efficacement les cellules de la mort cellulaire induite par le  $H_2O_2$  par rapport au curcumin seul à concentration égale. De plus, les Nps-Cur inhibent l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène ainsi que la consommation du glutathion induite par le  $H_2O_2$ . Finalement, la méthode d'imnunobuvardage de type Western a permis de mettre en évidence que les Nps-Cur sont également capables d'empêcher l'induction du facteur de transcription nucléaire antioxydant, Nrf2 en présence de  $H_2O_2$ .

#### 2.1.2 Contribution de l'étudiante

Cet article a été publié dans *Journal of Alzheimer disease* (impact facteur 4.174). Sur cet article, je suis en co-auteure avec Jasjeet Kaur Sahni (étudiante post-doc). Elle a mis au point la méthode de préparation et la caractérisation des nanoparticules. Cependant, j'ai préparé tous les échantillons et réalisé certains des répliquats. J'ai réalisé toutes les expériences de culture cellulaires et les immunobuvardages de type western. Jasjeet Kaur Sahni a rédigé la partie caractérisation et j'ai rédigé la partie biologie cellulaire de l'article. L'anglais et le style ont été corrigés par Madeleine Arseneault (assistante de recherche). La supervision de l'écriture et la soumission de l'article ont été réalisées par mon directeur de thèse le Pr. Charles Ramassamy. J'ai rédigé les réponses aux correcteurs sous supervision de mon Pr. Charles Ramassamy.

## 2.1.3 Neuronal uptake and neuroprotective effect of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the human SK-N-SH cell line

Sihem Doggui<sup>&a,b</sup>, Jasjeet Kaur Sahni<sup>&a,b,d</sup>, Madeleine Arseneault<sup>a</sup>, Lé Dao<sup>b</sup> and Charles Ramassamy<sup>a,c</sup>\*

a : INRS-Institut Armand-Frappier, 531, boul. des Prairies, H7V 1B7 Laval, Québec, Canada b : INRS-EMT, Québec, Canada, c: Faculté de Médecine, Université Laval, Canada d : Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Jamia Hamdard, New Delhi 110062, India

&: equal contribution

\*: corresponding author

Email : charles.ramassamy@iaf.inrs.ca Phone number: 1 450 687 5010

Keywords: Alzheimer disease, glutathione, reactive oxygen species, antioxidant, NRf2
#### ABSTRACT

Curcumin, a natural polyphenolic pigment present in the spice turmeric (Curcuma longa), is known to possess a pleiotropic activity such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-amyloid-B activities. However, these benefits of curcumin are limited by its poor aqueous solubility and oral bioavailability. In the present study, a polymer-based nanoparticles approach has been utilized to deliver drugs to neuronal cells. Curcumin was encapsulated in biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) based-nanoparticulate formulation (Nps-Cur). Dynamic laser light scattering (DLS) and transmission electronic microscopy (TEM) analysis indicated a particle diameter ranging from 80 to 120 nm. The drug entrapment percentage was around 31% with 15% drug-loading. In vitro release kinetics of curcumin from Nps-Cur revealed a biphasic pattern with an initial exponential phase followed by a slow release phase. Cellular internalization of Nps-Cur was confirmed by fluorescence and confocal microscopy with a wide distribution of the fluorescence in the cytoplasm and within the nucleus. The prepared nanoformulation was characterized for cellular toxicity and biological activity. Cytotoxicity assays showed that void PLGA-nanoparticles (Nps) and curcumin-loaded PLGA nanoparticles (Nps-Cur) were nontoxic to human neuroblastoma SK-N-SH cells. Moreover, Nps-Cur was able to protect SK-N-SH cells against  $H_2O_2$  prevent the elevation of reactive oxygen species and the consumption of glutathione induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Interestingly, Nps-Cur was also able to prevent the induction of the redox-sensitive transcription factor Nrf2 in the presence of H2O2. Taken together, these results suggest that Nps-Cur could be a promising drug delivery strategy to protect neurons against oxidative damage as observed in Alzheimer's disease.

#### **INTRODUCTION**

Alzheimer's disease (AD) represents the most common form of dementia and neurodegenerative disorders, and the most prevalent ailments of the current century. AD affects more than 24.3 million people worldwide and become one of the most severe progressive socio-economical and medical burden facing countries all over the world [1]. During the past two decades, considerable effort was aimed to a better understanding of the cause of this neurodegenerative disorder with the ultimate hope of developing safe and effective pharmacological treatments. Among them, choline esterase inhibitors were introduced with great expectations but only 25-50% of patients respond to this pharmacotherapy [2]. Furthermore, peripheral adverse effects were the most common causes for the discontinuation of this pharmacotherapy. Finally, irrespective of the form of therapy, the current therapies do not target the underlying pathogenesis of AD and thus provide only temporary symptomatic relief. Therefore, the treatment of AD still remains a high challenge and the development of new strategies is an active area of research. Among the different traditional medicines known, curcumin is one of the most extensively investigated candidates. Curcumin is a hydrophobic polyphenol derived from the rhizome (turmeric) of the herb Curcuma longa and has been identified as the active principle of turmeric. Curcumin is a biphenolic compound with hydroxyl groups at the *ortho*-position on the two aromatic rings that are connected by a ß-diketone bridge, containing two double bonds (dienone), which can undergo Michael addition, critical for some of the effects of curcumin [3], but contributing to chemical instability in aqueous solution [4]. Curcumin is also found to be photosensitive and requires careful handling. Although the application of turmeric in the treatment of a number of diseases is well documented in the books of Ayurveda, extensive research in the last decade have identified numerous cellular and molecular targets of curcumin. On several paradigms, curcumin has been shown to exhibit antioxidant, anti-inflammatory, metals chelator, anti-amyloid, anti-tau and neuroprotective activities (see review by [5]). For instance, several in vitro studies have demonstrated that curcumin inhibits amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) oligomers formation and cell toxicity at micromolar concentrations while in transgenic mouse models of AD, the administration of curcumin can reduce Aß plaques and Aß oligomers, suppressed inflammation, oxidative damage and improved cognitive deficits [6-11]. Curcumin is also a good inhibitor of the expression of inflammatory cytokines, cyclo-oxygenase-2, lipoxygenase, glycogen synthase-3ß [12] and iNOS,

likely by the inhibition of JNK/AP-1 and NF $\kappa$ -B mediated gene transcription [13,14]. Curcumin can also reduce neuro-inflammation caused by activated microglia induced by Aß deposition, which is involved in the physiopathology of AD [15]. Therefore, curcumin represents a promising compound for the treatment of AD. It has been hypothesized that its extensive use might account for the significantly lower prevalence of AD in the Asian-Indian population [16]. In spite of its efficacy and safety, curcumin has not yet been approved as a therapeutic agent due to its poor oral absorption in both humans and animals likely due to the hydrophobic nature of the molecule. Its low bioavailability has raised several concerns and may limit its clinical applications [17]. For instance, when curcumin was given orally at a dose of 2 g/kg to rats, maximum serum concentration was only 0.23 µg/mL after 1 h and levels of curcumin declined rapidly and were unquantifiable within 3 to 6 h after intake [18]. In healthy volunteers exposed to oral curcumin at supra-therapeutic doses (10-12 g/day), plasma levels reached only 160 nM [19]. The percentage of curcumin absorbed remained constant regardless of the dose indicating that administration of more curcumin did not result in higher absorption [20]. The low bioavailability of curcumin in healthy volunteers may explain the lack of efficacy on several clinical trials conducted with curcumin in AD or in mild cognitive impairment patients [21,22]. Hence, enhancement of curcumin solubility and/or stability following oral treatment represents a pharmacological challenge for its therapeutic applications. Several delivery strategies ways to overcome the poor bioavailability of curcumin have been studied, including adjuvants, liposomes, micelles, phospholipid complexes and nanoparticules are currently being investigated to enhance the bioavailability and biological activity of curcumin.

In the last decade, nanotechnologies have been used to enhance the solubility and the stability of curcumin with promising results [23,24]. Recently, several studies have demonstrated that the oral bioavailability of curcumin entrapped-nanoparticles is higher than free curcumin or curcumin administered with piperine as absorption enhancer (see recent reviews [5,24,25]). Several studies have developed nanoparticles for which the oral bioavailability was increased by 2 to 22-fold with a longer half-life [17,25-27]. Theracurmin, a new form of nanoparticles based-drug delivery system of curcumin with the mean size of 190 nm, have been shown to improve water solubility of curcumin and a 30-fold higher bioavailability than native curcumin after its oral administration [28]. In healthy human volunteers, a plasma curcumin level of 189+48 ng/ml was observed after an administration of a dose of 150 mg of Theracurmin, which correspond to

the intake of 8 g of conventional curcumin [29]. Therefore, current trends in curcumin research consist on the development of delivery systems based on biodegradable polymers to increase its solubility, stability and bioavailability for delivery of curcumin at or around targeted cells or tissues [30]. Among biodegradable polymers recently investigated poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) has been utilized as sustained-release drug delivery. The advantages of PLGA biodegradable polymer-based drug delivery system include biocompatibility, controllable biodegradability, absorbility, low toxicity of the degradation end products, sustained release potential, ease of administration, patient compliance, optimized efficacy, localized drug delivery, and high local drug concentrations. In particular, PLGA copolymers have gained strong success, because their release properties can be easily tailored by varying composition (lactide/glycolide ratio), molecular weight and is fully biodegradable [24]. The effects of PLGA-nanoparticles formulation with curcumin on neuronal cells remain poorly investigated.

In this study, we have developed curcumin-loaded PLGA nanoparticules (Nps-Cur), characterized the morphology, the particles size, evaluated the neuronal uptake and analyzed the neuroprotective effects of Nps-Cur in protecting neuronal cells from reactive oxygen species (ROS) and also determined the *in vitro* pharmacokinetics.

#### **MATERIALS AND METHODS**

#### Materials

Curcumin, Poly (lactide-co-glycolide) 65:35 (Mw 40 000 -75 000 Da) and dimethylammonium bromide (DMAB), dialysis bag (Mw cutoff 12-kDa), hydrogen peroxide (H2O2), cell survival assays Tox-8 (Resazurin based), monochlorobimane (MCB), glutathione-S-transferase, minimal essential medium Eagle (MEM), fetal bovine serum (FBS), penicllin, streptomycin, sodium pyruvate and anti-rabbit antibody were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Cytotoxicity Detection Kit-LDH (lactate dehydrogenase) was from Roche Diagnostics (Laval, Quebec, Canada). Ethyl acetate was purchased from Fisher (Ottawa, ON, Canada). 2',7'dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA) was from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Nuclear proteins extraction kit was from Active Motif (California, USA). BCA protein estimation kit was from Pierce Biotechnology (Rockford, USA). Anti-Nrf2 and anti-CREB were from Abcam (Cambrige, MA, USA). All chemicals used were of analytical grade. MilliQ water was used for all the experiments.

#### Methods Preparation of Nps and Nps-Cur

Among the various techniques available for the formulation of Nps, the choice of the method depends mainly on the solubility of the therapeutic moiety. Due to the hydrophobic properties of curcumin, Nps and Nps-Curs were prepared by emulsion–diffusion–evaporation method, as previously reported [31, 32] with slight modifications. Briefly, curcumin and polymer were dissolved in 9 ml of ethyl acetate under stirring for 1 h at 500 rpm. Then this organic phase was added in a drop wise manner to aqueous phase containing DMAB stabilizer (1% w/v) to form emulsion. This emulsion was stirred for 1 h followed by homogenization (Polytron PT4000; Polytron Kinematica, Switzerlandchange) at 15000 rpm for 5 min to reduce droplet size. The emulsion was then diluted with water to a large volume for solvent diffusion. The resulting formulation was then rotary evaporated for 3 h to remove the organic phase under reduced pressure. Nps-Cur was carried out at 15% polymer weight. For the formulation of Nps, the same procedure was followed without curcumin.

# Physicochemical Characterization of nanoformulations Dynamic light scattering (DLS) measurements

DLS measurements for determining the average size and size distribution of the Nps and Nps-Cur were performed using a using NanoS90 (Malvern instruments). A dilute suspension of the prepared Nps or Nps-Cur was put in glass cuvette and analysed. All the data analysis was performed in automatic mode. Measured size was presented as the average value of 5 measurements. The polydispersity index (PDI), having a value between 0 and 1 (0 being for monodispersed particles) was also obtained.

#### Transmission electron microscopy (TEM)

The morphology and the size of Nps and Nps-Cur were observed using a transmission electron microscopy (TEM, Hitachi H-7100) at 40 000X magnification. Briefly, a copper grid was placed on a drop (100  $\mu$ L) of Nps or Nps-Cur for 5 min and air-dried. The grid was then immerged in water for 1 min, air-dried and stained by adding one drop of 3% (w/v) phosphotungstic (PTA). After 1 min, the excess of the staining solution was removed with filter paper and the grid was air-dried once again before loading in the microscope and photographed.

## Analysis of photophysical properties of curcumin encapsulated in nanoparticulate curcumin and native curcumin

Encapsulation and binding of curcumin in hydrophobic core of Nps-Cur formulation was further examined by spectroscopic analysis [33]. We have measured the fluorescence spectra of both native curcumin (dissolved in methanol) and Nps-Cur (in aqueous solution) for the spectroscopic experiments. Aqueous Nps-Cur solution was vortexed followed by sonication for 1 min to get well dispersed solution. Fluorescence emission spectra of curcumin was recorded from 450 to 750 nm with an excitation wavelength fixed at 420 nm.

#### Drug entrapment of Nps-Cur

The percentage of drug incorporated during Nps-Cur preparation was determined by centrifuging the Nps-Cur at 20,000 rpm for 30 min and separating the supernatant. The pellet obtained was washed twice with water and dissolved in acetonitrile followed by the estimation of the drug by HPLC (Agilent Technologies 1200 series) equipped with an UV detector using an analytical column Eclipse XDB-C18 (4,6 mm ID x 250 mm, 5  $\mu$ m). Curcumin was eluted isocratically at a flow rate of 1 mL/min using mobile phase constituted by 40% phosphoric acid and 60% acetonitrile and detected at 420 nm At this wavelength there was no interference in the absorbance reading from the PLGA. The drug entrapment was calculated using the formula:

Drug entrapment (%) = Mass of drug in nanoparticles × 100 /Mass of drug used in formulation Mean values were reported from 3 individual experiments.

#### Analysis of photophysical properties of Nps-Cur and native curcumin

Encapsulation and binding of curcumin in Nps-Cur and native curcumin was further examined by spectroscopic analysis as previously reported [34]. The fluorescence spectra of both native curcumin (dissolved in methanol) and Nps-Cur were obtained. The Nps-Cur were vortexed followed by sonication for 1 min (5510 Branson) to get well dispersed formulation for spectroscopic studies. The fluorescence emission spectra were obtained from 450 nm to 750 nm with an excitation wavelength of 420 nm (SpectraMax M5, Molecular Devices).

#### In vitro release studies

The *in vitro* release of curcumin from the Nps-Cur was evaluated by dialysis membrane method. Briefly, 5 ml of the formulation was centrifuged at 20,000 rpm for 30 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet was suspended with 5 ml of MilliQ water. The process was repeated twice. Then the Nps-Cur solution was put in the pre-swelled dialysis bag. The dialysis bag was suspended in 50 ml of the release medium (50% v/v of ethanol) at 37 °C in a shaking water bath at 100 rpm. At regular intervals starting at 5 min, 5 ml of samples were withdrawn and replaced with an equivalent amount of the fresh dissolution medium. The samples were then analyzed by HPLC as described above [34]. Ethanol was used in the release media to provide sink conditions as curcumin is insoluble in water [35]. To analyze the release kinetics and mechanism, data were fitted to the following mathematical models [23]: 1-Zero order  $(M_1/M_0=k_0t)$ , 2-First order  $(M_1/M_0=1-exp(-k_1t))$  and Higuchi model  $(M_1/M_0=k_Ht_{1/2})$ . Where  $M_1/M_1$ is the fraction of drug release at time t and  $k_0$ ,  $k_1$  and  $k_H$  are zero order release constant, first order release constant and Higuchi constant respectively. The values of  $k_0$ ,  $k_1$  and  $k_H$  were determined by fitting the release data into respective equations. The best fitting model is the one with the highest correlation coefficients. The concentration of curcumin released from the Nps-Cur was expressed as a percentage of the total curcumin present in the Nps-Cur and was plotted as a function of time.

#### Culture assay Cell line

SK-N-SH cells, a human neuroblastoma cell line from ATCC (Manassas, VA, USA), were maintained in minimal essential medium eagle (MEM), supplemented with 10% (v/v) FBS, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and sodium pyruvate (1 mM) in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were grown to 80% confluence and then seeded in a multiwell cell culture plates for the experimental procedures.

#### In vitro cell viability assays in SK-N-SH cells

SK-N-SH cells were plated at a density of 2.0 x  $10^4$  cells/well in a 96-well plates and incubated for 24 h at 37 °C. Cells were then starved and treated with 5, 10 and 15 µl of Nps and Nps-Cur corresponding to 0,035; 0,07 and 0,1 µM of curcumin, respectively. For co-treatment experiments, cells were treated with 500µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cell death and survival were assessed 24 h after the treatment using the Cytotoxicity Detection Kit-LDH and Tox-8 (Resazurin based) as per the manufacturer's instructions. Values obtained from controls, untreated cells, were considered as 100%.

#### Intracellular reactive oxygen species (ROS)

Intracellular ROS accumulation was measured by following the oxidation of 2',7'dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA), a non-fluorescent, cell permeable dye which upon hydrolysis by intracellular esterase reacts with ROS to produce a highly fluorescent compound, 2',7'- dichlorofluorescein (DCF), which is trapped inside the cells. Briefly, SK-N-SH cells (2 x  $10^4$  / well) were plated into 96 well plates and allowed to attach for 24 h. After 24 h, cells were starved and co-treated with 5 µM of free curcumin used as positive control, Nps (10 µL) or Nps-Cur (10 µL) corresponding to 0,07 µM of curcumin and 1.0 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1h. DCF-DA was added to a final concentration of 10 µM for 20 min. Cells were then washed with PBS and the fluorescence was determined with the excitation/emission filters at 485/535 nm using a Synergy HT multidetection microplate reader.

#### Curcumin uptake in SK-N-SH cells by fluorescence method

Curcumin is naturally fluorescent in the visible green spectrum. In order to study the qualitative cellular uptake of the Nps-Cur, SK-N-SH cells were cultured on cover slips coated with poly-D-lysine at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells/well in 24 well plates. Cells were incubated for 24 h at 37 °C and then treated with 5  $\mu$ M of free curcumin (used as positive control) and Nps (10  $\mu$ L) or Nps-Cur (10  $\mu$ L) corresponding to 0,07  $\mu$ M of curcumin for 1 h. After incubation, cells were rinsed three times with 1 ml of PBS containing Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> to remove excess of Nps, Nps-Cur and free curcumin. Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) and the nuclei stained with 1  $\mu$ g/ml DAPI for 15 min. The glass slides were mounted with prolong gold antifade reagent and observed under a fluorescence microscopy (Leica ECB, Germany). Images were captured using a camera (SensiCam high performance) and Image-Pro plus version 5.0 software (Media Cybernetics, USA) under a FITC filter. For the confocal fluorescence analysis, cells were examined with an oil immersion Nikon Plan Apo 100 objective mounted onto a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon, Melville, NY, USA) equipped with a Bio-Rad Radiance 2000 confocal imaging system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

#### Protein extraction

SK-N-SH cells were treated with 1 mM of  $H_2O_2$  and 0,07  $\mu$ M of free curcumin, Nps or Nps-Cur at volume corresponding to 0,07  $\mu$ M of free curcumin for 30 min. SK-N-SH cells total proteins were extracted with a lysis buffer containing a cocktail of protease inhibitors and nuclear proteins were extracted using a kit from Active Motif. Total and nuclear proteins were quantified using the BCA test.

#### Determination of glutathione (GSH) level

Total proteins (50 µg) were transferred to 96-well plate, then 100 µL of MCB at 200 µM was added in each well and the reaction was started with 50 µL of GST at a final concentration of 1 U/mL. After 30 min of incubation at 37 °C, the fluorescence was recorded with  $\lambda$ ex at 360 nm and  $\lambda$ em at 460 nm using a Synergy HT multi-detection microplate reader.

#### Western blot analysis

Nuclear proteins (40 µg) were separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred into PVDF membranes. Membranes were blocked for 1 h in TBS with 5 % skim milk and incubated with primary antibodies anti-Nrf2 (1/1000) or anti-CREB (1/1000) followed by the secondary antibody HRP-conjugated anti-rabbit (1/5000). CREB was used as protein loading control. Detection was realized with Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate and the bands were visualized and quantified by densitometric analysis using luminescent imaging system FluorChem.

#### Statistical analysis

All data were expressed as means  $\pm$  SD from at least three independent experiments performed at least in triplicate. Statistical analysis was performed by a Dunnett't test. For Western-blot analysis, one-way ANOVA followed by Tukey test was used. The level of significance was considered when p-values were < 0.05.

#### RESULTS

#### Physicochemical properties and morphology of Nps and Nps-Cur

In order to ascertain compatibility between the drug and the polymer used, solutions of drug alone in acetonitrile (5  $\mu$ g/ml) (Fig. 1B), PLGA (10  $\mu$ g/ml) in acetonitrile (Fig. 1A) and a mixture of PLGA solution (95% v/v) and curcumin (5% v/v) in acetonitrile (Fig. 1C) were made and scanned from 200 nm to 800 nm. The UV spectra given in figure 1 indicated that the pattern of the mixture of PLGA and curcumin was similar to the pattern obtained with native curcumin. These results suggest that PLGA do not modified the absorbance spectrum of curcumin.

To confirm the solubility of our formulation, Nps-Cur dissolved in aqueous solution gave a clear, well-dispersed formulation with curcumin natural color (Fig. 2B) confirming the solubility of our formulation. In contrast native curcumin is poorly soluble in aqueous solution as undissolved curcumin is visible on the water's surface (Fig. 2A). PLGA is not soluble in water due to its hydrophobic character (Fig. 2C) while Nps are completely dispersed in water (Fig. 2D).

DLS was used to evaluate the size and size distribution of the Nps and Nps-Cur. The figure 3 (A and B), shows a narrow size distribution of the Nps and Nps-Cur ranging from 80 to 120 nm, with the mean particles at 100 nm. The polydispersity index (PDI) obtained from DLS was within the permissible range and remained below 0.25 thus indicating a homogeneous formulation. The size of prepared Nps and Nps-Cur was also estimated by TEM and is indicated on the figure 3 (C and D). Nps and Nps-Cur revealed their regular spherical shape. It is interesting to note that the morphology and the size of Nps-Cur are similar to Nps. The small particle size of the Nps and Nps-Cur prepared can be attributed to the presence of DMAB, which is reported to produce comparatively smaller particle size as compared to other stabilizers like PVA. The drug entrapment percentage was calculated to be 31 %.

To confirm the encapsulation as well as binding of curcumin in the hydrophobic core of Nps-Cur formulation, the photophysical property of curcumin was taken into consideration. The fluorescence spectra analysis of curcumin (from 450 to 700 nm) with excitation wavelength 420 nm was carried out and showed that native curcumin in methanolic solution exhibited a sharp fluorescence peak at 522 nm (Fig.4A), but the fluorescence spectrum of Nps-Cur was shifted

towards blue spectrum and showed a well defined peak at 491 nm (Fig.4B). This blue shift could be due to the binding of curcumin with in hydrophobic domain of PLGA present in Nps-Cur formulation [34].

#### Stability studies

The stability of Nps-Cur is important because it determines the expiration date of a particular formulation. The optimized Nps-Cur were evaluated for physical and chemical stability according to International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines after storage for 6 months. Nps-Cur were stored at 4 °C away from light and evaluated for particle size, morphology and drug content. There were negligible alterations in the values of optimized Nps-Cur after storage for 6 months under the given conditions. The total drug content in Nps-Cur was 56.5  $\mu$ g/ml and 58.3  $\mu$ g/ml, after a week and 6 months of storage, respectively. Results from TEM showed no differences in the size and morphology of the 1 week and 6 months old Nps-Cur. These results indicate that the developed Nps-Cur are physically and chemically stable and retain their pharmaceutical properties over a period of at least 6 months.

#### In vitro release studies of Nps-Cur

The method of dynamic dialysis was carried out to study the release property of curcumin from Nps-Cur. Due to low solubility of curcumin in water, 50% v/v of ethanol was used in which the solubility of curcumin was  $0,693\pm0,13$  mg/mL [36]. Figure 5 represents the release profile of curcumin from Nps-Cur. Curcumin released from the nanoformulation appeared to have two components. The first phase is an initial exponential phase releasing 74% of the drug in 6 h followed by a slow release phase releasing up to 81% of the drug in the next 16 h. The calculated values of release constants are determined by fitting the release data into respective equations along with regression coefficients (R<sub>2</sub>) given in Table 1. To find out the mechanism of curcumin release from the Nps-Cur, we analyzed regression coefficients obtained by fitting the data into different release models. It was concluded that Higuchi model best fitted the release kinetics data of curcumin with a R<sub>2</sub> value of 0.9484 and therefore the release of the drug from the formulation was mainly diffusion mediated.

#### Nps-Cur uptake by SK-N-SH cells

Development of Nps-Cur as an efficient delivery system would depend on their efficient internalization into, and sustained retention inside cells. Curcumin is a polypenolic compound with a photochemical property. We took the advantage of this property to investigate the ability of Nps-Cur to be taken up by SK-N-SH cells. For this, cells were incubated at 37 °C with 10  $\mu$ l of Nps-Cur (corresponding to the 0.07  $\mu$ M of curcumin), for 1 h and the cellular uptake was determined by fluorescence microscopy. Results showed that Nps-Cur was taken up 1 h after exposure (Fig. 6D). The internalized Nps-Cur were seen throughout the cytoplasm surrounding the nucleus and in dendrites. Interestingly, by confocal microscopy, the fluorescence was also observed in the nucleus (Fig. 6E). Cells incubated without treatment (negative control) and with Nps do not display fluorescence while in the presence of free curcumin at 5  $\mu$ M, used as positive control, cells display a green fluorescence due to the rapid internalization and accumulation of curcumin by cells (Fig. 6A, B and C). These results demonstrated that Nps-Cur are effectively taken up by neuronal cells.

#### Nps-Cur protect SK-N-SH cells

A very important aspect of the investigation of new polymeric nanoparticules formulation delivery systems and particularly for brain delivery is the analysis of their toxicity upon target cells. We have then evaluated the toxicity of Nps and Nps-Cur on SK-N-SH cells. Different doses of Nps and Nps-Cur were added to cell culture medium then cell death and survival were analyzed by Resazurin and LDH assays. Data on Resazurin assay showed that the number of cell survival was significantly reduced in the presence of Nps and Nps-Cur (Fig.7B). However, this assay reflects metabolic activity and we cannot exclude the possibility of an effect of Nps and Nps-Cur on the cell metabolic activity. The potential toxicity of Nps and Nps-Cur was then completed on LDH assay and data indicated that both Nps and Nps-Cur are non toxic (Fig.7A). Next, we have investigated the neuroprotective potential of Nps-Cur by challenging SK-N-SH cells with 500  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. Results on the figure 7 (C and D) showed that 10  $\mu$ l of Nps and Nps-Cur while native curcumin at 0.07  $\mu$ M, corresponding to the concentration obtained in 10  $\mu$ l of the Nps-Cur preparation, was not able to protect cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. These

colorimetric assays were confirmed by microscopic examination of cell morphology. As shown on the figure 8, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells became round up (Fig. 8B), detached from the bottom, and aggregated compared to control (Fig. 8A), Nps (Fig. 8C), or Nps-Cur (Fig. 8D), treated cells. These results confirm that Nps as well as Nps-Cur are nontoxic to neuronal SK-N-SH cell line.

#### Nps-Cur decreased ROS levels in SK-N-SH cells

The antioxidant activity of curcumin has been demonstrated on different paradigm. To determine the antioxidant effect of Nps-Cur, SK-N-SH cells were treated with 10  $\mu$ l of Nps and Nps-Cur. At the end of 1 h of treatment, the intensity of the fluorescence of DCF was significantly lower in the presence of Nps and Nps-Cur (Fig. 9A). Interestingly, when cells were challenged with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the effect of Nps-Cur was higher than Nps and is similar to the effect of curcumin at 5  $\mu$ M, used as positive control (Fig. 9B). These results indicate that Nps-Cur formulation retains the ability to degrade ROS.

#### Effect of Nps-Cur on glutathione levels in SK-N-SH cells

Glutathione (GSH) is the major endogenous antioxidant produced by the cells, participating directly in the neutralization of free radicals and ROS. Our results showed that 30 min incubation with  $H_2O_2$  at 1 mM induced a rapid and significant reduction of GSH in SK-N-SH cells. Interestingly, in the presence of Nps-Cur, the decrease of GSH induced by  $H_2O_2$  was prevented (Fig.10). The effect of Nps-Cur is similar to curcumin at 0.07  $\mu$ M. However, this result is of great interest because, as described above, the stability of curcumin in Nps-Cur is longer (at least 6 months) as compared to free curcumin.

#### Nps-Cur suppressed the activation of Nrf2

Nrf2 plays an important role in the control of the cellular redox potential by binding to antioxidant response elements and phase 2 enzymes. Based on the effect of Nps-Cur on ROS and GSH levels, we have then investigated the effect of Nps-Cur on the activity of Nrf2. For this, SK-N-SH cells were challenged with  $H_2O_2$  at 1 mM for 30 min and the level of Nrf2 in the nucleus fraction was measured by Western blot. The activity of Nrf2 induced by  $H_2O_2$  was

prevented in the presence of Cur, NPs and Nps-Cur with higher efficacy in the presence of NPs-Cur (Fig.11). Nps-Cur was as potent as curcumin at 0.07  $\mu$ M, the equivalent concentration of curcumin in Nps-Cur. In these conditions, Nps did not have any effect on the activity of Nrf2.

#### DISCUSSION

Curcumin has been shown to display complex and multifaceted activities as an antioxidant, antiinflammatory and anti-amyloid agent. Therefore, its represents one of the most promising compounds for the treatment of AD. Despite its in vitro and in vivo efficacy and safety, the clinical and therapeutics applications of curcumin have been limited by its insolubility in water and poor bioavailability. Using nanotechnology, some studies have demonstrated higher efficacy and bioavailability of curcumin on different paradigms. The choice of carrier material in the oral delivery system is of high importance because it significantly affects the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the drugs. The biocompatibility of the polymer used is another important parameter and encapsulating hydrophobic drugs in the polymer PLGA represents a promising strategy for sustained and controlled drug-delivery. Indeed, PLGA polymers are characterized by their biocompatibility and biodegradability, it is first degraded into its monomers, lactic and glycolic acid, which then enter the tricarboxylic acid cycle (Krebs' cycle), are metabolized and subsequently, eliminated from the body as carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and water (H<sub>2</sub>O) [37,38]. PLGA is used as an emulsifier and flavoring agent in the food industry and a pharmaceutical excipient. Finally, they have been approved by the U.S. Food and Drug Administration for pharmaceutical application. PLGA may enhance the oral absorption and bioavailability of curcumin by bypassing the P-glycoprotein-mediated efflux pump. It has been demonstrated that the mean permeability of curcumin coperfused with PLGA (1:9) was 3 times that of free curcumin in the jejunum [27]. The nanoparticles properties are typically strongly influenced by the preparation procedure.

We have prepared Nps-Cur by emulsion-diffusion-evaporation method, characterized the physico-chemical properties of nanoparticles, which represent important parameters to consider as they influence the physical stability, release kinetic, cellular uptake and intracellular trafficking. The successful binding of curcumin to the hydrophobic domain of PLGA-nanoparticles was confirmed by the blue shift fluorescence spectrum of Nps-Cur [34]. The size of the prepared nanoparticles is also an important characteristic [39] because of potential side effects. Indeed, nanoparticles with the size greater than 100 nm are easily captured by Küpffer cells or other phagocytic cells which thus that restrict their biodistribution [40] or can lead to pulmonary toxicity in addition to limit their access to the brain [41]. Morever, nanoparticules uptake depend on the surface chemistry, thus to increase the uptake some nanoparticles were

coated with PEG [33]. Our Nps and Nps-Cur displayed a narrow size distribution ranging from 80 to 120 nm, with the mean particles at 100 nm. Our nanoparticles size is in the range of the size which have been reported to avoid opsonisation [42], resulting in prolonged duration of action as well as enhancing the drug to specific sites [43]. The size of nanoparticles is influenced by the stabilizers [25]. Our formulation used an aqueous phase containing DMAB as stabilizer. Usually, poly(vinlalcohol) (PVA) is widely used as stabilizer for PLGA polymers. The use of DMAB as stabilizer allows the formation of smaller sized particles compared to PVA [44,45]. In addition to the particle size, the distribution of the particle size could impact on the regular pharmacokinetic parameters. Indeed, a value of size distribution or PDI > 0.3 indicates that the distribution of the particle size is large and heterogeneous. The PDI of our nanoformulation was below 0.25 thus indicating a homogenous formulation. These results suggest that the quantity of Nps-Cur taken up by each cell will be similar. Therefore, the concentration of curcumin released from the nanoparticles in each cell will be the same. The drug encapsulation percentage of compound on nanoparticles is an important property for drug delivery system. This parameter is linked to PLGA concentration, molecular weight, the ratio lactic/glycolic acid and the nature of the stabilizer used [46]. We have successfully encapsulated 31% of curcumin into PLGAnanoparticle.

One of the most important findings of our study is the huge elevation of the stability and the solubility of the Nps-Cur. These results are consistent to other studies [27,34]. Indeed, it has been reported that 90 % of free curcumin is degraded after 30 min in phosphate buffer (0,01 M, pH 7,4) [47]. *In vitro* release study of Nps-Cur presents a biphasic release profile. The initial exponential phase was probably due to the release of curcumin which was either close and/or adsorbed on the surface of the Nps-Cur. The slow release phase was due to the diffusion of the dissolved drug within the core of the PLGA of the Nps-Cur into the release medium followed by the degradation of polymer matrix. The exponential release pattern of drugs from the PLGA-nanoparticles has also been reported [48,49]. Similar trends of release were also described with curcumin entrapped in glycerol monooleate or PLGA based nanoparticles [25,34]. The prediction of the release profile is complex because it results from a combined effect of various parameters: solid-state drug polymer solubility [50] and drug-polymer interactions [51], polymer degradation rate [52], polymer molecular weight and PDI [53]. The release of drug from the drug-to-polymer ratio [42] as it has been observed that

the release was faster from those nanoparticles with higher drug content [54]. A number of other mechanisms such as desorption of the surface bound or adsorbed drug, diffusion of the drug from the polymer matrix, surface and bulk degradation and combined degradation and diffusion process have been reported to explain the release of the drug from the biodegradable particles [55]. PLGA is reported to undergo bulk degradation with the release of the drug occurring mainly both by diffusion and degradation of the matrix itself [56].

Neuronal cellular uptake of Nps-Cur is a crucial property to consider for their neuroprotective activity. Our *in vitro* cellular uptake results demonstrated a better uptake of Nps-Cur in SK-N-SH cells compare to free curcumin. These data are in agreement with a report by Anand et al. [17] that showed higher cellular uptake of curcumin loaded nanoparticles in human chronic myeloid leukemia KBM-5 than free curcumin. The uptake of PLGA-nanoparticles has been demonstrated to be through an endocytic process and the uptake is time-and-concentration dependent and could be saturable [57]. Time-dependent studies also showed that following their uptake, nanoparticles were transported to endosomes (see review by [58]), then nanoparticles escaped from lysosomes within 10 min of incubation and entered into the cytoplasm. The therapeutic agent from degradation due to lysosomal enzyme. In accordance with these results, our results on neuronal cells demonstrated that after a 60 min of incubation, Nps-Cur were widely distributed in the cytosol and in the nucleus. More studies are required to better understand the factors that affect the cellular uptake of nanoparticles, and their intracellular trafficking to further explore the drug delivery application of nanoparticles.

Another important factor to consider is the potential toxicity of these Nps-Cur, which will limit the dose of the drug that could be delivered. On LDH assay, our results demonstrated that our Nps or Nps-Cur formulation is not toxic to neuronal cells. However, data obtained from the Resazurin assay suggest that nanoparticles could reduce SK-N-SH cells metabolic activity. It has been noted that some types of nanoparticles could reduce cells activity by directly targeting mitochondria activity and may generate injurious responses [59]. However, in the presence of curcumin, we cannot exclude the possibility of a decrease of cell survival due to the inhibition of the Akt pathway [60]. The divergent effect of Nps-Cur on cell survival in the absence or in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could be due to the upregulation of different cellular protective enzymes (heme oxygenase-1, thioredoxin) or pathways (Nrf2) induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In AD, ROS play an important role in inflammatory, neuronal damage and cell death. Oxidative stress is also suggested to play an important role early in the pathophysiology of AD, preceding amyloid deposition and toxicity [61-63]. Therefore, an ideal strategy to effectively neutralize ROS is to successfully deliver antioxidants to inter- and intracellular compartments in brain, as well as to maintain the enzyme activity to neutralize the effect of free radicals that are formed over time. PLGA-nanoparticles has been demonstrated to be an effective system to deliver at a sustained rate the antioxidant curcumin in the brain with higher accumulation in hippocampus 1 hr after an i.v. administration of PLGA-nanoparticles [26]. The hippocampus is well-known to play an important role in learning and memory and is degenerated in AD. Moreover, oxidative stress and neuroinflammation are elevated in the hippocampus from AD and mild cognitive impairment patients. However, the antioxidant activity of curcumin-loaded nanoparticles on neuronal cells is poorly investigated. Our data demonstrated that 0.07 µM of curcumin entrapped in Nps-Cur decreased ROS levels as efficiently as 5 µM of free curcumin. Our results strengthen the protective effect of curcumin entrapped in NPs previously described on SK-N-SH cells with different doses of NanoCurc<sup>TM</sup> (1 nM to 5 µM) [64]. Regarding the effects of Nps and Nps-Cur on ROS levels, several nanoparticles have been shown to interfere with ROS [59]. For instance, chitosan-nanoparticles have been shown to interfere with ROS levels [65,66] while fullerenesnanoparticles composed by carbon has been shown to have an antioxidant effect by scavenging the free radicals [67]. Until now, there is no data available on the interaction between PLGAnanoparticles and free radicals because in numerous studies on PLGA-nanoparticles, data on the void nanoparticles were missing [17, 68-71]. Interestingly, our data revealed that our NPs can decrease ROS levels in SK-N-SH cells likely due to the recombination between peroxyl free radicals PLGA chains [72]. However, more studies are required to better understand the relationship between the surface area of nanoparticles and ROS levels.

The antioxidant activity displayed by the Nps-Cur in neuronal cells was also confirmed by the prevention of the decrease of the GSH levels induced by  $H_2O_2$ . The antioxidant effect of Nps-Cur was similar to free curcumin at 0.07  $\mu$ M. However, as described above, the entrapped curcumin is highly stable and considering the sustained release of curcumin by nanoparticles, the effect obtained with Nps-Cur on GSH level should occur for a longer period. Finally, based on the effect of Nps-Cur on ROS and GSH levels, we have then investigated the effect of Nps-Cur on the activity of Nrf2. Our results also showed that Nps-Cur was as effective as free curcumin in

the prevention of the induction of the activity of Nrf2 induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. These results are of great interest because many studies clearly demonstrate that activation of Nrf2 target genes in astrocytes and neurons is strongly protective against inflammation, oxidative damage, and cell death.

#### CONCLUSION

The enhancement of the solubility of curcumin as well as its stability will bring it to the forefront of therapeutic applications. SK-N-SH neuronal cells were used in this study to analyze the uptake of Nps-Cur with the aim to target neuronal cells using a biodegradable and biocompatible polymer. We have successfully formulated and characterized Nps and Nps-Cur. Our results show that the Nps and Nps-Cur formulations had a size around 100 nm, the optimum size range for cellular uptake [73]. The stability of Nps-Cur was observed until 6 months of storage and the kinetic of the release of curcumin from the nano-formulation is biphasic. Nps-Cur are significantly taken up by SK-N-SH cells with the fluorescence distributed in the cytoplasm and the nucleus. Our Nps and Nps-Cur are not toxic to neuronal cells and can protect SK-N-SH cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>--induced toxicity, prevent ROS elevation, GSH decrease and the activation of Nrf2. Taken together, these data are of great interest because, in physiological conditions, the stability of Nps-Cur is longer than native curcumin. Thus, PLGA-nanoparticles provided and efficient delivery system for encapsulated curcumin. Overall, our results indicate that Nps-Cur have the capacity to protect human neuronal cells against oxidative damage as observed in AD. This formulation is likely to have a great potential for pharmacological application in neurodegenerative disorders such as AD.

#### Legends

**Table 1**: Release parameters for curcumin in nanoformulation obtained after fitting the *in vitro* release data to different release models.

Fig. 1. Ultraviolet–Visible absorbance spectrum of PLGA and native curcumin in acetonitrile. Scan of (A) PLGA (10  $\mu$ g/ml), (B) native curcumin (5 g/ml) and (C) mixture of PLGA solution (95% v/v) and curcumin (5% v/v).

**Fig. 2.** Solubility of curcumin and PLGA (native and in formulation) in water. Solution of free curcumin (A), Nps-Cur (B), native PLGA (C) Nps (D).

**Fig. 3.** Size and morphological characterization of Nps and Nps-Cur using dynamic laser light scattering (DLS) and transmission electron micrograph (TEM). DLS analysis of polymeric Nps (A) and Nps-Cur (B) and TEM photographs of Nps (C) and Nps-Cur (D).

**Fig. 4.** Analysis of photophysical properties of native curcumin and Nps-Cur. (A) Fluorescence spectrum of native curcumin in methanolic solution and (B) fluorescence spectrum of Nps-Cur in aqueous solution.

**Fig. 5.** In vitro release kinetics studies *In vitro* release kinetics of curcumin from Nps-Cur in 50% v/v of ethanol at 37 °C. Values reported are mean  $\pm$  SD from 3 different experiments.

Fig. 6. Cellular uptake of native curcumin, Nps and Nps-Cur in SK-N-SH cells. Cell nuclei were stained with DAPI (blue) and cellular uptake of curcumin or Nps-Cur (green fluorescence) was monitored by fluorescence (A-D) and confocal (E) microscopy. SK-N-SH cells were treated for

1 h at 37 °C with water (A), Nps (B), 5 μM of curcumin used as positive control (C) and Nps-Cur (D,E).

**Fig. 7.** Effects of Nps and Nps-Cur on cell death and viability with or without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Effects of different doses of Nps and Nps-Cur on SK-N-SH cells death analyzed by LDH assay (A, C), on cells survival analyzed by Resazurin assay (B, D) 24 h after different treatments. 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L and 15  $\mu$ L of Nps-Cur correspond to 0,035  $\mu$ M, 0,07  $\mu$ M and 0,1  $\mu$ M of curcumin, respectively. Results are expressed as percentage of control (considered as 100%). Data are means ± SD from at least three separate experiments performed in sixtuplate for each group. \*P < 0.05 and \*\*P<0.01 versus control (A,B) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group (C,D).

Fig. 8. Photomicrographs of SK-N-SH cells after 24 h of treatment with (A)  $H_2O_1$  (B)  $H_2O_2$  (1mM), (C) Nps (10µl) and (D) Nps-Cur (10µl) at 400X magnification.

**Fig. 9**. Effects of Nps and Nps-Cur on ROS levels. Effect of Nps and Nps-Cur on the intensity of the fluorescence of DCF analyzed 1 h after the treatment of SK-N-SH cells in the absence (A) or in the presence of 1.0 mM of  $H_2O_2$  (B). Results are expressed as percentage of control (considered as 100%). Data are means  $\pm$  SD from at least three separate experiments performed in sixplicate with \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 *versus* control (A) or  $H_2O_2$  group (B).

Fig. 10. Effects of curcumin, Nps and Nps-Cur on the level of GSH. SK-N-SH cells were cotreated with curcumin, Nps or Nps-Cur and 1 mM of  $H_2O_2$  for 30 min. GSH levels were determined on proteins from lysed cells. Results are expressed as percentage of control (considered as 100%). Data are means ± SD of at least three separate experiments performed in triplicate for each group. \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 *versus*  $H_2O_2$  group.

Fig. 11. Effects of Nps and Nps-Cur on the nuclear expression of Nrf2. SK-N-SH cells were cotreated with curcumin (0.07  $\mu$ M), Nps or Nps-Cur (10 $\mu$ l) in the presence of 1 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min then Nfr2 expression was determined by Western blot on the nuclear fraction. CREB was used as a marker for equal protein loading in each well. Bar graph represents the means  $\pm$  SD from three separate experiments with \*\*\*P < 0.001 versus control group; # P < 0.001 versus Nps-Cur group.

### Table 1

Parameters	Mathematic models for drug release kinetics		
	Zero order	First order	Higuchi model
К	13.108	0.2409	35.414
R <sup>2</sup>	0.8954	0.643	0.9484

























119







Figure 11



References:

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M (2005)
 Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112-2117.

[2] Giacobini E (2000) Cholinesterase inhibitors stabilize Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 920, 321-327.

[3] Weber WM, Hunsaker LA, Gonzales AM, Heynekamp JJ, Orlando RA, Deck LM, Vander Jagt DL (2006) TPA-induced up-regulation of activator protein-1 can be inhibited or enhanced by analogs of the natural product curcumin. *Biochem Pharmacol* 72, 928-940.

[4] Pan MH, Huang TM, Lin JK (1999) Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos* 27, 486-494.

[5] Abdenour B, Doggui S, Dao L, Ramassamy C (2011) Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer's disease. *Expert Rev Mol Med* 13, 1-15.

[6] Garcia-Alloza M, Borrelli LA, Rozkalne A, Hyman BT, Bacskai BJ (2007) Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J Neurochem* 102, 1095-1104.

[7] Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM (2001) The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 21, 8370-8377.

[8] Frautschy SA, Hu W, Kim P, Miller SA, Chu T, Harris-White ME, Cole GM (2001) Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of A beta-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiology of Aging* 22, 993-1005.

[9] Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kayed R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* 280, 5892-5901.

[10] Yanagisawa D, Taguchi H, Yamamoto A, Shirai N, Hirao K, Tooyama I (2011) Curcuminoid binds to amyloid-beta1-42 oligomer and fibril. *J Alzheimers Dis* 24 Suppl 2, 33-42.

122

[11] Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M (2004) Curcumin has potent antiamyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J Neurosci Res* 75, 742-750.

[12] Bustanji Y, Taha MO, Almasri IM, Al-Ghussein MA, Mohammad MK, Alkhatib HS (2009) Inhibition of glycogen synthase kinase by curcumin: Investigation by simulated molecular docking and subsequent in vitro/in vivo evaluation. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24, 771-778.

[13] Wang HM, Zhao YX, Zhang S, Liu GD, Kang WY, Tang HD, Ding JQ, Chen SD (2010) PPARgamma agonist curcumin reduces the amyloid-beta-stimulated inflammatory responses in primary astrocytes. *J Alzheimers Dis* 20, 1189-1199.

[14] Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC (2003) Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 23, 363-398.

[15] Zekry D, Epperson TK, Krause KH (2003) A role for NOX NADPH oxidases in Alzheimer's disease and other types of dementia? *IUBMB Life* 55, 307-313.

[16] Ganguli M, Dodge HH, Chen P, Belle S, DeKosky ST (2000) Ten-year incidence of dementia in a rural elderly US community population: the MoVIES Project. *Neurology* 54, 1109-1116.

[17] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 4, 807-818.

[18] Perkins S, Verschoyle RD, Hill K, Parveen I, Threadgill MD, Sharma RA, Williams ML, Steward WP, Gescher AJ (2002) Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 535-540.

[19] Mancuso C, Siciliano R, Barone E (2011) Curcumin and Alzheimer disease: this marriage is not to be performed. *J Biol Chem* 286, le3; author reply le4.

[20] Ravindranath V, Chandrasekhara N (1981) Metabolism of curcumin--studies with [3H]curcumin. *Toxicology* 22, 337-344.

[21] Baum L, Lam CW, Cheung SK, Kwok T, Lui V, Tsoh J, Lam L, Leung V, Hui E, Ng C, Woo J, Chiu HF, Goggins WB, Zee BC, Cheng KF, Fong CY, Wong A, Mok H, Chow MS, Ho

PC, Ip SP, Ho CS, Yu XW, Lai CY, Chan MH, Szeto S, Chan IH, Mok V (2008) Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. *J Clin Psychopharmacol* **28**, 110-113.

[22] Ringman JM, Younkin SG, Pratico D, Seltzer W, Cole GM, Geschwind DH, Rodriguez-Agudelo Y, Schaffer B, Fein J, Sokolow S, Rosario ER, Gylys KH, Varpetian A, Medina LD, Cummings JL (2008) Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease. *Neurology* **71**, 85-92.

[23] Belkacemi A, Doggui S, Dao L, Ramassamy C (2011) Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med* **13**, e34.

[24] Sahni JK, Doggui S, Ali J, Baboota S, Dao L, Ramassamy C (2011) Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease. *J Control Release* **152**, 208-231.

[25] Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, Singh D, Kumar MN (2009) Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *Eur J Pharm Sci* **37**, 223-230.

[26] Tsai YM, Chien CF, Lin LC, Tsai TH (2011) Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration. *Int J Pharm* **416**, 331-338.

[27] Xie X, Tao Q, Zou Y, Zhang F, Guo M, Wang Y, Wang H, Zhou Q, Yu S (2011) PLGA nanoparticles improve the oral bioavailability of curcumin in rats: characterizations and mechanisms. *J Agric Food Chem* **59**, 9280-9289.

[28] Sasaki H, Sunagawa Y, Takahashi K, Imaizumi A, Fukuda H, Hashimoto T, Wada H, Katanasaka Y, Kakeya H, Fujita M, Hasegawa K, Morimoto T (2011) Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. *Biol Pharm Bull* **34**, 660-665.

[29] Kanai M, Imaizumi A, Otsuka Y, Sasaki H, Hashiguchi M, Tsujiko K, Matsumoto S, Ishiguro H, Chiba T (2011) Dose-escalation and pharmacokinetic study of nanoparticle curcumin, a potential anticancer agent with improved bioavailability, in healthy human volunteers. *Cancer Chemother Pharmacol* 

[30] Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN, Aggarwal BB (2008) Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol* **76**, 1590-1611.

[31] Kreuter J (1994) Drug targeting with nanoparticles. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **19**, 253-256.

[32] Hariharan S, Bhardwaj V, Bala I, Sitterberg J, Bakowsky U, Ravi Kumar MN (2006) Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy. *Pharm Res* 23, 184-195.

[33] Sahu A, Bora U, Kasoju N, Goswami P (2008) Synthesis of novel biodegradable and self- assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomater* **4**, 1752-1761.

[34] Mohanty C, Sahoo SK (2010) The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. *Biomaterials* **31**, 6597-6611.

[35] Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, Singh D, Kumar MNVR (2009) Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **37**, 223-230.

[36] Kakkar V, Singh S, Singla D, Kaur IP (2011) Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin. *Mol Nutr Food Res* **55**, 495-503.

[37] Mittal G, Carswell H, Brett R, Currie S, Kumar MN (2011) Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology. *J Control Release* **150**, 220-228.

[38] Maurus PB, Kaeding CC (2004) Bioabsorbable implant material review. *Operative Techniques in Sports Medicine* **12**, 158-160.

[39] Davis SS (1997) Biomedical applications of nanotechnology--implications for drug targeting and gene therapy. *Trends Biotechnol* **15**, 217-224.

[40] Wisse E LA (1984) Structural elements determining transport and exchange process in the liver. In: Davis SS, Illum L, McVie JG, Tomlinson E, editors. Microspheres and drug therapy, pharmaceutical, immunological and medical aspects. Amsterdam: Elsevier 1-23.

[41] Sonavane G, Tomoda K, Makino K (2008) Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces* **66**, 274-280.

[42] Allemann E, Leroux JC, Gurny R, Doelker E (1993) In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm Res* **10**, 1732-1737.

[43] Banerjee T, Mitra S, Kumar Singh A, Kumar Sharma R, Maitra A (2002) Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* 243, 93-105.
[44] Sonaje K, Italia JL, Sharma G, Bhardwaj V, Tikoo K, Kumar MN (2007) Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. *Pharm Res* 24, 899-908.

[45] Swarnakar NK, Jain AK, Singh RP, Godugu C, Das M, Jain S (2011) Oral bioavailability, therapeutic efficacy and reactive oxygen species scavenging properties of coenzyme Q10-loaded polymeric nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 6860-6874.

[46] Wischke C, Schwendeman SP (2008) Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int J Pharm* **364**, 298-327.

[47] Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, Lin JK (1997) Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal* **15**, 1867-1876.

[48] Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS (1999) PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J* Control Release 57, 171-185.

[49] Saxena V, Sadoqi M, Shao J (2004) Enhanced photo-stability, thermal-stability and aqueous-stability of indocyanine green in polymeric nanoparticulate systems. *J Photochem Photobiol B* **74**, 29-38.

[50] Panyam J, Williams D, Dash A, Leslie-Pelecky D, Labhasetwar V (2004) Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *J Pharm Sci* 93, 1804-1814.

126

[51] Lee J, Cho EC, Cho K (2004) Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles. *J Control Release* 94, 323-335.

[52] Horisawa E, Hirota T, Kawazoe S, Yamada J, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y (2002) Prolonged Anti-Inflammatory Action of DL-Lactide/Glycolide Copolymer Nanospheres Containing Betamethasone Sodium Phosphate for an Intra-Articular Delivery System in Antigen-Induced Arthritic Rabbit. *Pharmaceutical Research* **19**, 403-410.

[53] Matsumoto J, Nakada Y, Sakurai K, Nakamura T, Takahashi Y (1999) Preparation of nanoparticles consisted of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) and their evaluation in vitro. *Int J Pharm* **185**, 93-101.

[54] Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KP, Ramasamy M, Suresh B (2009) Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. *Nanomedicine* 

[55] Sinha VR, Trehan A (2003) Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release* **90**, 261-280.

[56] Makino K, Mogi T, Ohtake N, Yoshida M, Ando S, Nakajima T, Ohshima H (2000) Pulsatile drug release from poly (lactide-co-glycolide) microspheres: how does the composition of the polymer matrices affect the time interval between the initial burst and the pulsatile release of drugs? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **19**, 173-179.

[57] Panyam J, Labhasetwar V (2003) Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharm Res* 20, 212-220.
[58] Panyam J, Labhasetwar V (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 329-347.

[59] Nel A, Xia T, Madler L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 622-627.

[60] Wang H, Geng QR, Wang L, Lu Y (2012) Curcumin potentiates antitumor activity of lasparaginase via inhibition of the AKT signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*  [61] Belkacemi A, Ramassamy C (in press) Time sequence of oxidative stress in the brain from transgenic mice models of Alzheimer's disease related to the amyloid-ß cascade. *Free Radic Biol Med* 

[62] Baldeiras I, Santana I, Proenca MT, Garrucho MH, Pascoal R, Rodrigues A, Duro D, Oliveira CR (2010) Oxidative Damage and Progression to Alzheimer's Disease in Patients with Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis* 

[63] Lovell MA, Markesbery WR (2007) Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **85**, 3036-3040.

[64] Ray B, Bisht S, Maitra A, Lahiri DK (2011) Neuroprotective and neurorescue effects of a novel polymeric nanoparticle formulation of curcumin (NanoCurc → TM) in the neuronal cell culture and animal model: Implications for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 23, 61-77.

[65] Cho Y, Shi R, Ben Borgens R (2010) Chitosan nanoparticle-based neuronal membrane sealing and neuroprotection following acrolein-induced cell injury. *J Biol Eng* **4**, 2.

[66] Xie W, Xu P, Liu Q (2001) Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. Bioorg Med Chem Lett 11, 1699-1701.

[67] Partha R, Conyers JL (2009) Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. *Int J Nanomedicine* **4**, 261-275. [68] Anand P, Nair HB, Sung B, Kunnumakkara AB, Yadav VR, Tekmal RR, Aggarwal BB (2010) Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochemical Pharmacology* **79**, 330-338.

[69] MUKERJEE A, VISHWANATHA JK (2009) Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. *Anticancer research* **29**, 3867.

[70] Reddy M, Wu L, Kou W, Ghorpade A, Labhasetwar V (2008) Superoxide Dismutase-Loaded PLGA Nanoparticles Protect Cultured Human Neurons Under Oxidative Stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **151**, 565-577.
[71] Reddy MK, Wu L, Kou W, Ghorpade A, Labhasetwar V (2008) Superoxide dismutaseloaded PLGA nanoparticles protect cultured human neurons under oxidative stress. *Appl Biochem Biotechnol* **151**, 565-577.

[72] Loo JS, Ooi CP, Boey FY (2005) Degradation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA) by electron beam radiation. *Biomaterials* **26**, 1359-1367.

[73] Win KY, Feng SS (2005) Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* **26**, 2713-2722.

#### 2.1.4 Conclusion de l'article 1

Dans cette étude, nous avons préparé des nanoparticules vides (Nps) ou encapsulant du curcumin (Nps-Cur). Étant donné que le choix de la méthode de préparation des nanoparticules va influencer les propriétés physicochimiques des particules (*e.g.* la taille, la stabilité, la cinétique de relargage et l'internalisation cellulaire) nous avons utilisé la méthode d'émulsion-évaporation de solvant. En effet, cette méthode permet de faire varier facilement la taille de nanoparticules en fonction de la vitesse d'homogénéisation utilisée.

Nous avons dans un premier temps caractérisé les nanoparticules, afin de vérifier que la formulation a été correctement réalisée [548]. À l'aide du spectre de fluorescence du curcumin, nous avons vérifié que le curcumin est bien encapsulé dans les nanoparticules et qu'il interagit avec le polymère via son domaine hydrophobe [548]. Cependant, les mécanismes d'interaction entre le curcumin et le polymère ne sont pas clairement définis. Un des paramètres les plus importants à contrôler lors de la préparation des nanoparticules est leur taille. En effet, elle va influencer leur passage à travers les différentes barrières biologiques (barrière sanguine, gastrointestinale et hémato-encéphalique). Les Nps et les Nps-Cur ont une taille comprise entre 80 à 120 nm. Nous avons démontré par microscopie à fluorescence et confocale que le curcumin était internalisé par les cellules SK-N-SH dans le cytoplasme et le noyau et donc que les nanoparticules permettraient de protéger le principe actif et d'augmenter sa solubilité apparente dans le milieu de culture facilitant ainsi sa pénétration cellulaire par simple diffusion. Il a été cependant, montré que les nanoparticules de PLGA peuvent pénétrer dans la cellule par des mécanismes d'endocytose [496, 557]. De plus, l'internalisation cellulaire des nanoparticules dépend également de leur charge. Dans notre étude, l'évaluation de ce paramètre par zêta potentiel est manquante. Or, le DMAB, utilisé en tant que stabilisateur permet non seulement, la formation de particules de petite taille, mais modifie aussi leur charge surfacique. Ainsi, les nanoparticules chargées positivement ont une meilleure interaction avec les cellules chargées négativement ce qui par conséquent augmente leur internalisation cellulaire [558]. Nous n'avons pas réalisé des études expérimentales permettant de déterminer la voie spécifique d'internalisation donc dans le futur, plusieurs études seront réalisées afin de mieux comprendre les facteurs qui agissent sur l'absorption cellulaire des nanoparticules de PLGA.

Le pourcentage d'encapsulation du curcumin dans les nanoparticules est de 31%. Ce paramètre est important, car il influence la cinétique de relargage du curcumin en modulant son taux et son temps de relargage. La cinétique de relargage *in vitro* des Nps-Cur suit un profil biphasique avec une phase initiale exponentielle due au relargage du curcumin qui se trouve adsorbé à la surface des Nps-Cur et une phase de relargage plus lente qui correspond à la diffusion du curcumin encapsulé au coeur des Nps-Cur. Des études ont montré que la diffusion du curcumin à travers la matrice serait causée par la dégradation de la matrice polymérique [463]. Les paramètres pouvant moduler le profil de relargage *in vitro* des nanoparticules sont : le poids moléculaire, le ratio acide lactique/acide glycolique, les interactions entre le composé encapsulé et le polymère ainsi que le pourcentage d'encapsulation [491]. L'augmentation de l'encapsulation du curcumin aura pour conséquence la réduction de la prise de médicament pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Nous avons également déterminé leurs effets toxiques ou neuroprotecteurs sur les cellules SK-N-SH. Cette étape est cruciale pour les composés permettant le transport d'agents thérapeutiques. La mesure de la libération de la LDH (test de mortalité cellulaire) dans le milieu de culture démontre que les nanoparticules Nps-Cur sont non-toxiques et protègent contre la mortalité induite par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cependant, les résultats obtenus au test du résazurin suggèrent que les Nps-Cur modifient le métabolisme cellulaire des cellules SK-N-SH. Des études suggèrent que cette diminution de l'activité métabolique serait due à l'action directe des nanoparticules de PLGA sur les mitochondries [559]. Le paramètre qui pourrait être modulé afin de réduire les dommages mitochondriaux causés par les nanoparticules serait la composition de la matrice polymérique (rapport acide lactique/ acide glycolique).

Par ailleurs, nous avons montré que les Nps-Cur protègent plus efficacement que le curcumin libre contre le stress oxydatif induit par l'  $H_2O_2$  en réduisant le niveau des espèces réactives de l'oxygène et en protégeant de la diminution de la GSH induite par le  $H_2O_2$ . Il est intéressant de noter que les Nps réduisent également le niveau des espèces réactives de l'oxygène. Jusqu'alors les interactions entre le PLGA et les espèces réactives de l'oxygène étaient peu connues, car de nombreuses études n'incluent pas l'effet des nanoparticules vides dans leurs résultats [543, 560, 561]. Ainsi, des études supplémentaires apparaissent alors nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes existants entre le PLGA et le stress oxydatif. En se basant sur les résultats précédents, nous avons évalué l'expression du facteur de transcription antioxydant, Nrf2 induit par le  $H_2O_2$ . Les résultats obtenus suggèrent que les Nps-Cur protègent aussi efficacement que le curcumin libre contre l'activation de Nrf2 induite par le  $H_2O_2$ . Or, les Nps-Cur sont stables pendant plusieurs mois alors que le curcumin libre est dégradé en 30 min donc le curcumin encapsulé permettrait une modulation de la voie de signalisation redox à plus long terme. En se basant sur ces résultats, il serait intéressant d'étudier l'effet des Nps-Cur sur d'autres voies de signalisation impliquées dans la maladie d'Alzheimer telles que les voies impliquées dans la survie cellulaire, l'apoptose et l'inflammation.

En conclusion, les Nps-Cur préparées ont la capacité de protéger *in vitro* les cellules neuronales humaines contre les dommages oxydatifs tels qu'observés dans la maladie d'Alzheimer. Cette formulation pourrait donc avoir un vaste champ d'application pharmacologique, particulièrement dans le traitement des maladies neurodégénératives. Cependant, comparé à d'autres nanoparticules composées de PLGA le pourcentage d'encapsulation du curcumin est relativement faible, il peut atteindre jusqu'à 90% [543]. Dans l'étude de Mukerjee [543] le rapport acide lactique/acide glycolique est 50:50 alors que le rapport du PLGA utilisé pour les Nps-Cur est 65:35. Ainsi, le changement de polymère permettrait d'améliorer le pourcentage d'encapsulation du curcumin dans les Nps-Cur et de moduler leur cinétique de relargage *in vitro* ce qui conduirait ultimement à la réduction de la prise de traitement par les patients. La solution que l'on propose serait de modifier la composition de la matrice polymérique par la modulation du rapport acide lactique/ acide glycolique en utilisant du PLGA 50:50 pour remplacer le PLGA 63:35.

# 2.2 ARTICLE 2 : L'influence de la composition de la matrice polymérique des nanoparticules composées de PLGA sur le pourcentage d'encapsulation et le relargage in vitro du curcumin

# 2.2.1 Résumé de l'article 2

Nous avons précédemment démontré que les Nps-Cur 65:35 augmentent la solubilité apparente et la stabilité du curcumin et protègent les cellules SK-N-SH plus efficacement que le curcumin libre contre le stress oxydatif induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en protégeant de la diminution du GSH et de l'induction du facteur de transcription Nrf2. Nous avons également déterminé que 31% du curcumin était encapsulé dans ces nanoparticules. Le profil de libération du curcumin est biphasique avec une première phase exponentielle atteignant 74% de la concentration de curcumin encapsulé au bout de 6h suivi d'une phase de libération plus lente atteignant 81% pendant les 16h suivantes. L'importance de l'augmentation du pourcentage d'encapsulation et le prolongement de la libération du curcumin permettront d'améliorer à plus long terme son efficacité in vivo, dans le but ultime de réduire la dose et la fréquence de la prise de médicaments par les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Le principal facteur agissant sur ces deux paramètres est la composition de la matrice polymérique. En effet, il a été montré que la dégradation et le relargage d'un composé bioactif par les nanoparticules formées de PLGA sont dépendants de l'hydrophobicité du polymère qui varie en fonction de la proportion du ratio acide lactique/d'acide glycolique en considérant l'acide glycolique (monomère le plus hydrophile) en tant que facteur limitant [562].

Ainsi, notre hypothèse de recherche est que le changement de polymère permettrait d'influencer le pourcentage d'encapsulation et de prolonger le relargage du curcumin par les Nps-Cur. Pour cela, nous avons encapsulé le curcumin dans des nanoparticules formées d'une matrice polymérique de PLGA 50:50, c'est-à-dire composée de 50 % d'acide lactique et de 50% d'acide glycolique (Nps 50 :50 et Nps-Cur 50:50). Ces nanoparticules ont été synthétisées par la méthode d'émulsion-évaporation de solvant.

133

Dans un premier temps, leurs propriétés physico-chimiques ont été caractérisées. La taille et la morphologie des Nps-Cur 50:50 ont été déterminées par DSL et confirmées par TEM. Le pourcentage d'encapsulation du curcumin par les Nps-Cur 50:50 a été déterminé par la méthode de la dialyse. L'internalisation des Nps-Cur 50:50 par les cellules SK-N-SH a été déterminée par microscopie confocale *via* la détection de l'auto-fluorescence du curcumin.

Dans un second temps, nous avons déterminé si l'encapsulation du curcumin dans les Nps-Cur 50 :50 permettait de maintenir son effet biologique. Pour cela, les tests de l'ORAC et du DPPH, ont permis de montrer que l'encapsulation du curcumin par les nanoparticules augmentent sa capacité antioxydante et que par conséquent, que l'inhibition intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène induit par le  $H_2O_2$  proviendrait de leur capacité de piégeage des radicaux libres. Finalement, afin de mieux comprendre les mécanismes neuroprotecteurs des Nps-Cur 50:50 nous avons étudié par immunobuvardage de type Western trois voies de signalisation impliquées dans la maladie d'Alzheimer. Les résultats obtenus suggèrent que les Nps-Cur 50:50 empêchent l'induction de la voie de signalisation antioxydante, Keap1/Nrf2, inhibe l'activation de la voie pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B et la phosphorylation de la protéine Tau induite par le  $H_2O_2$ .

Finalement, nous avons conclus cette étude par la comparaison des deux types de nanoparticules composées de PLGA 50:50 et 65 :35permettant ainsi de souligner l'importance du choix de la matrice polymérique lors de la synthèse de nanoparticules encapsulant des composés bioactifs. En effet, la modulation de ce paramètre permettrait d'affiner la libération du composé encapsulé en fonction de l'application souhaitée.

# 2.2.2 Contribution de l'étudiante

Cet article a été soumis dans le *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (impact facteur 6.930). J'ai défini et mené les expériences de cet article avec les conseils de mon directeur de thèse. J'ai effectué le travail d'écriture avec l'aide et la supervision de mon directeur de recherche. La soumission de l'article a été réalisée par mon directeur de thèse le Pr. Charles Ramassamy.

# 2.2.3 Stable curcumin-Loaded PLGA Nanoparticles suppressed Akt /Tau phosphorylation and enhanced the anti-inflammatory and antioxidant activities of curcumin. Effet of the polymer composition

Sihem Doggui<sup>a,b</sup>, Ghislain Djiokeng Paka<sup>a,c</sup>, Jasjeet Sahni<sup>d</sup>, Lé Dao<sup>b</sup> and Charles Ramassamy<sup>a,c\*</sup>

a : INRS-Institut Armand-Frappier, 531, boul. des Prairies, H7V 1B7 Laval, Québec, Canada,

b : INRS-EMT, Québec, Canada, c: INAF, Université Laval, Canada

d : Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Jamia Hamdard, New Delhi 110062, India

# \*: corresponding author

Email : charles.ramassamy@iaf.inrs.ca Phone number: 1 450 687 5010

Words count: Abstract: 144 Body text+figure legends: 4886 Number of figures: 6 Number of table: 1 Number of references : 40

# Abstract

Curcumin is a promising therapeutic compound for Alzheimer's disease (AD). However, its poor absorption and brain bioavalability limited its efficacy in the brain. Biodegradable nanoparticles mediated delivery of curcumin may be an excellent approach to enhance its bioavailability in the brain. Using a biocompatible and biodegradable, poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) polymer, we have recently developed curcumin-loaded nanoparticles (Nps-Cur). We have demonstrated that Nps-Cur increased the uptake of curcumin into the neuronal cell line SK-N-SH. Here, we demonstrated that Nps-Cur was able to suppress the phosphorylation of Akt and Tau protein induced by  $H_2O_2$  and displayed higher anti-inflammatory and antioxidant activities than curcumin. Moreover, our data demonstrated that the drug entrapment percentage of curcumin is higher with PLGA 50:50 than PLGA 65:35 reaching 81% and the kinetic of the release was also prolonged. Our study demonstrated that the Nps-Cur could act on several pathways implicated in the pathophysiology of AD. Furthermore, these data highlight the importance of the polymer composition in the nanoparticle properties. Overall, these results suggest that PLGA nanoparticles are a promising approach in the elaboration of strategy for brain delivery of compounds against cerebral pathologies.

Key words: Alzheimer.'s disease, Akt, Nrf2, NF-κB, ORAC Running title: Neuroprotective effect of PLGA nanoparticles

# Introduction

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common forms of dementia [1]. The current treatments are associated with severe peripheral side-effects which limit their use [2]. Therefore, the development of novel strategies for combating AD remains a great challenge. The physiopathology of AD is multifactorial and implicates the deregulation of numerous molecular markers such as the  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ), tau-phosphorylation level, inflammation and oxidative stress in the brain [3]. Indeed, it is well established that oxidative stress can induce neuronal cell death and neurodegeneration [4-6]. Interestingly, data obtained from patients with mild cognitive impairment (MCI), a preclinical stage of AD strongly suggest that oxidative stress represents a major determinant of the pathogenesis and progression of AD [7-9]. This notion is strengthened by data obtained from transgenic mouse models of AD [10].

Curcumin, a hydrophobic polyphenolic compound, has been investigated for its neuroprotective effects and as a promising molecule for the treatment of AD [11]. Curcumin displays pleiotropic activities such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-amyloïd, anti-tau hyperphosphorylation and metal chelation (see review by [12]). For instance, we have recently demonstrated that curcumin protects neuronal cells against acrolein-induced toxicity by reducing the intracellular levels of ROS and by modulating redox regulated proteins and survival networks such as NF- $\kappa$ B, Nrf2, pGSK3 and pAkt, all of which are implicated in the pathogenesis of AD [13-15]. In the brain, acrolein is a by-product of lipid peroxidation [5]. It was found to be associated with proteins that were detected in neurofibrillary tangles and dystrophic neuritis surrounding senile plaques in AD [16]. A significant increase of acrolein level was observed in specific regions of the brain such as hippocampus, amygdale, and cerebellum from early AD as compared to control subjects [17]. In spite of its in vitro and in vivo efficacy and its safety, curcumin has not yet been approved as a therapeutic agent due to its poor oral absorption caused by the high hydrophobicity of the molecule. Hence, low bioavailability limits its clinical application. Thus, to enhance the solubility and stability of curcumin, we have encapsulated this compound in biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA 65:35) nanoparticles with a ratio of 65% of the lactic acid and 35% of glycolic acid (Nps-Cur 65:35) [18]. PLGA nanoparticles have been extensively studied for the development of drug delivery systems and has been approved by the FDA for various therapeutic

applications (see review by [19]). Moreover, several studies demonstrated that PLGA nanoparticles increased the concentration of curcumin in various organs including the brain and particularly in hippocampus following an intraperitoneal injection [20, 21]. We have previously demonstrated that Nps-Cur 65:35 increased the solubility, stability, antioxidant activity and the uptake by neuronal cells (SK-N-SH) of curcumin compared to free curcumin [18]. With this device, we found an drug entrapment percentage of 31%. The in vitro release kinetic of curcumin from these nanoparticles presents a biphasic pattern with an initial exponential release of 74% of the drug in a 6 h phase period followed by a slow release phase releasing up to 81% of the drug during the next 16 h. The aim of this study was to determine the effect of polymer composition on the overall efficacy of our technology i.e. on their drug entrapment percentage, their in vitro release kinetic and their neuroprotective activity. Studies have suggested that polymer composition plays an important role in the hydrophobicity and in the rate of degradation of the polymeric matrix [22, 23]. Regarding PLGA, physical properties themselves have been shown to be dependent upon multiple factors, including the initial molecular weight and the ratio of lactide to glycolide [24]. The presence of methyl side groups in lactide component makes it more hydrophobic than the glycolide component and PLGA copolymers with more lactide are less hydrophilic, so less able absorb water, therefore will be subject to a very slow degradation [19]. But even if polymer composition can affect the liberation, the effect of different compositions on their final efficacy is not easily predictable. So, in the present study, we have investigated the effect of a different ratio of lactic and glycolic acid on the neuroprotective efficacy by using PLGA 50:50 polymer, instead of PLGA 65:35 as previously [18]. We found that Nps-Cur 50:50 preserved and enhanced the neuroprotective activity of curcumin by modulating survival networks such as NF-kB, Nrf2, Akt and Tau phosphorylation, all of which are implicated in the pathogenesis of AD. Moreover, as the polymer composition plays an important role in the hydrophobicity and in the rate of degradation of the polymeric matrix [22, 23], we have improved some physicochemical properties of Nps-Cur by using PLGA 50:50. Our data demonstrated that PLGA nanoparticles 50:50 induced higher drug entrapment percentage, delayed the in vitro kinetic release of curcumin.

Overall, these results provide a new approach in the development of an effective therapeutic strategy for AD.

# Methods

Curcumin, Poly (lactide-co-glycolide) 50:50 (Mw 40 000 -75 000 Da), dimethylammonium bromide (DMAB), dialysis bag (Mw cut-off 12kDa), hydrogen peroxide  $(H_2O_2)$ , minimal essential medium Eagle (MEM), fetal bovine serum (FBS), penicllin, streptomycin, sodium pyruvate and anti- rabbit were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Ethyl acetate was purchased from Fisher (Ottawa, ON, Canada). 2',7'dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA) was from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Nuclear protein extraction kit was from Active Motif (California, USA). BCA protein estimation kit was from Pierce Biotechnology (Rockford, USA). All chemicals used were of analytical grade. MilliQ water was used for all the experiments.

Rabbit polyclonal anti-phospho-Akt (pAkt-Ser473) was purchased from Cell Signaling Technology. Polyclonal rabbit polyclonal Keap 1 and anti-Nrf2 antibodies were from Abcam (Cambridge, MA, USA). Rabbit polyclonal anti-NF-KB p50 antibody was from Delta Biolabs (Gilroy, CA, USA). Rabbit polyclonal anti pTau (ser 214) antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, U.S.A.). Rabbit polyclonal anti pTau (ser 400/Thr 403/ ser 404) antibody was from cell signaling (11837) Mouse monoclonal anti-GAPDH antibody was from Chemicon (Millipore, Mississauga, ON, Canada). Rabbit and mice horseradish peroxydase (HRP) were obtained from Sigma- Aldrich, Inc. MilliQ water was used for all the experiments. Fluorescence emission with different probes was recorded using Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader.

# Preparation of Nps and Nps-Cur

Nps-Cur were prepared by an emulsion-diffusion-evaporation method, as previously reported [18]. Briefly, curcumin and polymer were dissolved in ethyl acetate. Then, this organic phase was added to aqueous phase containing DMAB stabilizer (1% w/v) to form an emulsion. This emulsion was stirred and homogenized (Polytron PT4000; Polytron Kinematica, Switzerlandchange) at 15000 rpm for 5 min to reduce droplet size. The emulsion was diluted with MiliQ water for solvent diffusion and was then rotary evaporated to remove the organic phase under reduced pressure. Nps-Cur 50:50 was carried out at 15% polymer weight. For the formulation of Nps, the same procedure was followed without curcumin.

# **Physicochemical characterization of nanoformulations**

#### Particle size and zeta potential

DLS measurements for determining the average size, the size distribution and the polydispersity index (PDI) of the Nps and Nps-Cur were performed using a NanoS90 (Malvern instruments). The zeta potential of nanoparticles was measured by a Zetaszier. Effective mean diameter and zeta potential of the nanoparticles was obtained from 3 runs of 3 different samples.

#### Transmission electron microscopy (TEM)

The morphology and the size of Nps and Nps-Cur were observed using TEM (Hitachi H-7100) at 40,000× magnification. Briefly, a copper grid was placed on a drop (100  $\mu$ L) of Nps or Nps-Cur and air-dried. The grid was then immerged in water, air- dried, and then stained by adding one drop of 3% (w/v) phosphotungstic (PTA). Then the grid was air-dried before loading in the microscope and photographed.

## Drug entrapment percentage of Nps-Cur

The percentage of drug incorporated during Nps-Cur preparation was determined by HPLC (Agilent Technologies 1200 series) equipped with an UV detector using an analytical column Eclipse XDB-C18 (4,6 mm ID×250mm, 5 $\mu$ m) as previously described <sup>16</sup>. The drug entrapment percentage was calculated using the formula:

Drug entrapment (%) = (Mass of drug in nanoparticles/Mass of drug used in formulation) X 100 Mean values were reported from three individual experiments.

# In vitro release studies

The in vitro release of curcumin from the Nps-Cur was evaluated by dialysis membrane method using pre-swelled dialysis bag with a 12-kDa molecular weight cutoff as previously described <sup>16</sup>. At regular intervals starting at 5 min, 5 ml of samples were withdrawn and replaced

with an equivalent amount of the fresh dissolution medium. The samples were then analyzed by HPLC as described above <sup>21</sup>. The concentration of curcumin released from the Nps-Cur was expressed as a percentage of the total curcumin present in the Nps-Cur and was plotted as a function of time.

# Antioxydant oxidant activity assays

# 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities

The DPPH scavenging activity of free curcumin, Nps and Nps-Cur was measured by colorimetric method [26]. 20  $\mu$ L of samples (0.5  $\mu$ M) was mixed with 200  $\mu$ L of DPPH solution (0.2 mM in 95% ethanol). The reaction mixture was incubated for 30 min in the darkness at room temperature. The absorbance of the resulting solution was measured at 517 nm with a spectrophotometer. The radical scavenging capacity of the tested samples was measured by determining the Inhibition percentage (IE) using the following equation: IE = [(Acontrol – Asample)/Acontrol] × 100%. Assays were carried out at least in triplicate and at least three independent experiments were performed.

# Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay

ORAC assay was conducted using fluorescein as fluorescent probe, according to previous report [27, 28] with slight modifications. 25  $\mu$ L antioxidant [Trolox (1–8  $\mu$ M) or sample (Cur, Nps and Nps-cur at 0.5  $\mu$ M)] were mixed with 150  $\mu$ L fluorescein, and incubated at 37 °C for 15 min. Then 25  $\mu$ L AAPH was applied to the mixture. The whole assay lasted for 90 min. The fluorescence was determined with the excitation/emission filters at 485/535 nm using a Synergy HT multidetection microplate reader. AAPH and Trolox solutions were prepared freshly and fluorescein was diluted from a stock solution (1.17 mM) in 75 mM phosphate buffer. Final ORAC values were expressed as  $\mu$ mol Trolox equivalent/ $\mu$ mol antioxidant. Assays were carried out at least in triplicate and at least three independent experiments were performed.

#### Culture assay

# Cell line

SK-N-SH cells, a human neuroblastoma cell line from ATCC (Manassas, VA, USA), were maintained in MEM, supplemented with 10% (v/v) FBS, 1% *penicillin-streptomycin* and sodium pyruvate (1mM) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were grown to 80% confluence and then seeded in multiwell cell culture plates for the experimental procedures.

# Intracellular reactive oxygen species (ROS)

Intracellular ROS accumulation was measured by following the oxidation of 2',7' - dichlorofluoresceindiacetate (DCF-DA). Briefly, SK-N-SH cells ( $2 \times 104$  /well) were plated into 96 well plates and allowed to attach for 24 h. After 24 h, cells were starved and co-treated with three different concentrations (0.07  $\mu$ M, 0.25  $\mu$ M et 0.5  $\mu$ M) free curcumin, Nps (corresponding to an volume equivalent to the concentration ofcurcumin) or Nps-Cur and 1.0 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h. DCF- DA was added to a final concentration of 10  $\mu$ M for 20 min. The fluorescence was then determined with the excitation/emission filters at 485/535 nm using a Synergy HT multidetection microplate reader.

# Curcumin uptake in SK-N-SH cells by confocal microscopy

Curcumin is naturally fluorescent in the visible green spectrum. In order to study the qualitative cellular uptake of the Nps-Cur, SK-N-SH cells were cultured on cover slips coated with poly-D-lysine at a density of  $1.5 \times 10$  cells/well in 24-well plates. Cells were incubated for 24 h at 37°C and then treated with 5  $\mu$ M of free curcumin (used as positive control), Nps (corresponding to an volume equivalent to the concentration of curcumin) or Nps-Cur for 1 h. Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde and the nuclei stained with 1  $\mu$ g/ml DAPI for 15 min. The glass slides were mounted with prolong gold antifade reagent and observed under a confocal microscopy (LSM 780, Zeiss). For the confocal fluorescence analysis, cells were examined using 63× oil immersion objective on a LSM 780 confocal microscope (Zeiss). After acquisition, images were processed using Zen 2011 Zeiss LSM Image Browser software for postcapture and fluorescence quantification imaging processes.

#### Protein extraction

SK-N-SH cells were treated with 1 mM of  $H_2O_2$  and 0.05  $\mu$ M of free curcumin, Nps, or Nps-Cur for 30 min (Nrf2 and P50) or for 1h (pAkt, pTau and Keap1). SK-N-SH cells total proteins were extracted with a lysis buffer containing a cocktail of protease inhibitors and nuclear proteins were extracted using a kit from Active Motif. Total and nuclear proteins were quantified using the BCA test.

# Western blot analysis

Equal amount of protein cell lysates (30  $\mu$ g) were separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred into PVDF membranes. Membranes were blocked for 1 h in TBS with 5% skim milk and incubated with primary antibodies: anti-Keap 1 (1/700), pAkt (1/1000), anti-Nrf2 (1/1000), anti-NF- $\kappa$ B p50 (1/500), anti-pTau (1/500) and anti- GAPDH (1/1000). Amido black 1X was used for rapid staining of total protein bands. Blots are stained for 1 min and then distained for 30 minutes in 25% (v/v) isopropanol, 10% (v/v) acetic acid. Then membrane was incubated with the secondary antibody HRP- conjugated anti-rabbit or anti-mouse (1/10000) for 1 h. Detection was realized with Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate and the bands were visualized and quantified by densitometric analysis using luminescent imaging system FluorChem.

#### Gelatine Zymography

SK-N-SH were co-treated with 0.5  $\mu$ M of curcumin, Nps or Nps-Cur and with 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h. The supernatants (30  $\mu$ l corresponding to 1×106 cells) were mixed with a 4X nonreducing Laemmli's sample buffer (40% glycerol, Tris-HCl 1M pH 6.8, SDS 8%) and run on 7.5% acrylamide gels containing 2 mg/ml gelatin. Gels were washed for 30 min twice with 2.5% Triton X-100 and incubated overnight in digestion buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM and CaCl2 5 mM). Gels were stained with Coomassie blue 0.1% and destained).

#### Statistical analysis

All data were expressed as means  $\pm$  SEM from at least three independent experiments performed at least in triplicate. Statistical analysis was performed by a oneway ANOVA followed by Tukey test were used. The level of significance was considered when p < 0.05.

# Results

# Characterisation of prepared PLGA nanoparticles (Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50).

The Figure 1 shows that the mean particle size were  $161.6 \pm 1.6$  nm with a width of 55.33  $\pm$  12.8 nm and 125  $\pm$  31.5 nm with a width of 39  $\pm$  6.2 nm for Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50 respectively. Their size and shape were confirmed by TEM (Figure 1 C, D). Both formulations present a regular and spherical shape. It is interesting to note that the morphology and the size of Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50 are similar. The PDI obtained from DLS were 0.3 and 0.12, respectively (Table 1). These data indicate that when curcumin is associated to nanoparticles, Nps-Cur 50:50 formulation displayed higher homogenous distribution than Nps 50:50 because its PDI is within the permissible range and remained below 0.3. The zeta potentials of Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50 were  $6.4 \pm 0.3$  and  $63 \pm 3.9$  mV, respectively, and those from Nps 65:35 and Nps-Cur 65:35 were  $26 \pm 8,2$  mV and  $55 \pm 5,0$  mV, respectively. These data suggest that Nps-Cur 50:50 and Nps-Cur 65:35 formulation, in this environment (pH, ionic strength) is more stable than Nps 50:50 and Nps 65:35 formulation because the electrostatic repulsion between the particles should have a minimum zeta potential of  $\pm$  30 mV. The amount of drug loading in the nanoparticles plays an important role with respect to the rate and duration of drug release as well as its efficacy. The drug entrapment percentage of curcumin in Nps-Cur 50:50 was determined by HPLC and calculated to reach  $80 \pm 9.01\%$  which is higher than Nps-Cur obtained from PLGA 65:35 which was 31% [18].

#### In vitro release kinetics of curcumin released from Nps-Cur 50:50

The method of dynamic dialysis was carried out to study the release property of curcumin from Nps-Cur 50:50. Due to low solubility of curcumin in water, 50% v/v of ethanol was used in which the solubility of curcumin was  $0.693 \pm 0.13$  mg/mL [29]. The release profile of curcumin from Nps-Cur 50:50 displayed a biphasic profile. A rapid and exponential phase releasing 35% of the drug was observed in the first 6 h followed by a slow release phase, which maintained the curcumin release at 35% for at least the next 48 h. The exponential phase of release obtained with the Nps-Cur 50:50 is lower than with Nps-Cur 65:35 which released 74% of the drug after 6 h (Figure 2, *A*, *B*).

# Nps-Cur 50:50 uptake by SK-N-SH cells

To assess the uptake of curcumin into cultured neurons, SK-N-SH cells were incubated with 5 $\mu$ M of free curcumin, Nps-Cur 50:50 or with an equivalent volume of Nps 50:50 for 1 h at 37°C. Controls cells and cells incubated with Nps 50:50 did not display fluorescence while in the presence of free curcumin, cells displayed an intense green fluorescence due to the rapid internalization and accumulation of curcumin inside the cells (Figure 2, *B-E*). The internalization of curcumin were seen primarily in the cytoplasm surrounding the nucleus and in dendrites (Figure 2 D, E). Quantitative analysis indicated that encapsulation increased the uptake of curcumin by SK-N-SH cells by 4.4 fold (Figure 2, *F*). These results suggest that Nps-Cur 50:50 increases the uptake of curcumin by neuronal cells compared to free curcumin.

# Antioxidant activity of the Nps-Cur 50:50 and their effects on the Nrf2 pathway

The DPPH test was assessed to study the free-radical scavenging capacity of Nps-Cur 50:50 in comparison with free curcumin. Nps 50:50 did not show any free-radical scavenging activity while free curcumin and Nps-Cur 50:50, at 0.5 µM, showed the same antioxidant capacity (25% of DPPH inhibition) (Figure 3, A). Interestingly, we have observed a significant difference between Nps 50:50 and Nps –Cur 50:50 indicating that the antioxidant effect of Nps-Cur 50:50 was especially due to the curcumin. This property was then confirmed by the ORAC assay, which measures the antioxidant scavenging activity against the peroxyl radical induced by the thermolysis of AAPH at 37 ° C [30]. As shown in the Figure 3B, 0.5 µM of Nps-Cur 50:50 displayed 1.5 and 3.1 fold higher antioxidant capacity against peroxyl radical than free curcumin and Nps, respectively. The antioxidant effect of Nps-Cur 50:50 was then determined on SK-N-SH cells by DCFDA assay. For that purpose, SK-N-SH cells were treated with three different concentrations (0.07 µM, 0.25 µM and 0.5 µM) of curcumin and Nps-Cur 50:50 and a volume equivalent of Nps 50:50. After 1 h of treatment, the intensity of the fluorescence of DCF was significantly reduced by the three different concentrations in the presence of Nps-Cur 50:50 and with Nps 50:50 (Figure 3, C). Interestingly, the three concentrations of compound tested reduced significantly the ROS-level induced by  $H_2O_2$  (Figure 3, D). These data strengthened the results obtained on DPPH and ORAC assays and demonstrated that the loaded curcumin into Nps-Cur 50:50 preserved the antioxidant activity. Moreover, the encapsulation of curcumin increases its

antioxidant capacity. Based on the effect of Nps-Cur 50:50 on DPPH, ORAC and ROS levels, we have investigated the effect of Nps-Cur 50:50 on the antioxidant pathway Nrf2/Keap1. To determine the expression level of Nrf2 in the nucleus, SK-N-SH cells were co-treated with 1 mM of  $H_2O_2$  for 30 min and with 0.5  $\mu$ M of free curcumin and Nps-Cur 50:50 and with an equivalent volume of Nps 50:50. In SK-N-SH cells, the activation of Nrf2 by  $H_2O_2$  was prevented in the presence of curcumin, Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50 (Figure 4 ,*A*). However, the preventive effect of Nps-Cur 50:50 was significantly greater than free curcumin and Nps 50:50. As the activity of Nrf2 is regulated by the inhibitory protein Keap1, we have also evaluated the cytoplasmic level of keap1 in the presence of 1 mM of  $H_2O_2$  for 1h. Interestingly, Nps-Cur 50:50 also prevented Keap1 expressions induced by  $H_2O_2$  (Figure 4, *B*).

# Effects of free curcumin, Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50 on inflammatory pathways.

MMP-9 is the major MMP expressed and released by neurons. It contributes to neuroinflammation response in AD [31]. We have thus analyzed the effect of free curcumin at 0.5  $\mu$ M, Nps-Cur 50:50 at 0.5  $\mu$ M and Nps 50:50 with equivalent volume of curcumin, on the levels of gelatinolytic MMPs induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in SK-N-SH cells (Figure 5, *A*). Gelatin zymography of the culture medium of SK-N-SH cells showed that the release of MMP-9 was inhibited by Nps-Cur 50:50 whereas no effect of curcumin neither by Nps 50:50 was observed. Hence, these results demonstrated that Nps-Cur 50:50 were more efficient than curcumin on MMP-9 activity. We have thus investigated the effect of Nps-Cur 50:50 on the NF-kB pathway by analyzing the cytoplasmic and nuclear expression of the subunit p50 subunit of NF-kB (Figure 5, *B*, *C*). For this, SK-N-SH cells were co-treated for 30 min with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and with 0,5  $\mu$ M of curcumin or Nps-Cur 50:50 or with an equivalent volume of Nps 50:50. Curcumin and Nps-Cur suppress the increase of the nuclear expression of p50 induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

# Effects of free curcumin and Nps-Cur on pAkt/pTau pathways.

To determine whether Akt pathway is implicated in the neuroprotective effect of Nps-Cur, we have examined the phosphorylation of Akt at the serine 473 by western blot. The results showed that curcumin, Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50 decreased Akt phosphorylation induced by  $H_2O_2$  (Figure 6, *A*). Our results also demonstrated that oxidative stress induced the phosphorylation of Tau at the ser 400/Thr 403/ ser 404 sites. Interestingly, curcumin and Nps-Cur 50:50 treatments decreased the phosphorylation level (Figure 6, *B*).

# Discussion

Effective drug delivery to the CNS to treat neurodegenerative diseases such as AD still remains a challenge. To overcome drugs with limited access to the brain, encapsulation by nanocarriers appears to be a promising avenue. Among various nanocarriers, PLGA polymeric nanoparticles are promising candidates, as they could protect some drugs from their enzymatic degradation [20, 32] and increase their brain bioavailability and particularly in hippocampus following their intravenous or intraperitoneal injection [21,33]. Curcumin is one of the most extensively investigated natural compounds for the treatment of AD as it has been demonstrated to be able to target several cascades involved in the pathogenesis of AD [12]. In order to increase its solubility, stability and consequently its systemic bioavailability, we have successfully encapsulated curcumin in polymeric PLGA nanoparticles with a ratio lactic acid/glycolic acid of 65:35 (Nps-Cur 65:35) [18]. We have characterized the physico-chemical properties of the Nps-Cur 65:35 and demonstrated their neuronal uptake with a wide intracellular distribution [18].

Moreover, they were stable for at least 6 months of storage. To go further insight into the properties of Nps-Cur 50:50, in this study, we demonstrated that Nps-Cur 50:50 displayed higher antioxidant and anti-inflammatory activities than curcumin. Interestingly, Nps-Cur 50:50 was also able to prevent Akt and tau phosphorylation. Moreover, we found that the drug entrapment percentage and the drug release kinetic of curcumin were improved with the PLGA 50:50 as compared to PLGA 65:35. Our results on DPPH and ORAC assays demonstrated that the encapsulation in PLGA nanoparticles preserves the antioxidant and scavenging properties of curcumin. Moreover, in ORAC assays, Nps-Cur 50:50 displayed a higher peroxyl radical scavenging activity as compared to curcumin. It is interesting to note that on ORAC and DCF-DA assays, void nanoparticles displayed an antioxidant activity. The recombination between peroxyl free radicals and PLGA chains could reduce ROS level [34]. In order to validate the biological activity of Nps-Cur 50:50, we have analyzed their effects on three signalling pathways (Nrf2, NF-kB and Akt/pTau) involved in the regulation of oxidative stress, inflammation and on the phosphorylation of tau which are relevant to the pathophysiology of AD [35]. Our results also demonstrated that the property of curcumin on the Nrf2 activity is maintained for curcumin loaded-PLGA 50:50 and it is similar to PLGA 65:35 [18]. NF-kB is a well-known transcription factor involved in the regulation of inflammatory responses, which triggers the activity of MMP-9. We found that Nps-Cur 50:50 treatment resulted in reduced expression of MMP-9 with higher

efficiency than free curcumin, which can be attributed to the sustained release of curcumin from PLGA nanoparticles and the enhancement of cellular uptake of Nps-Cur. These data are in accordance with the anti-inflammatory activity of curcumin, which is mediated through the inhibition of NF-kB [36]. Indeed, these data demonstrated that curcumin encapsulated in PLGA nanoparticles is more potent than free curcumin to inhibit NF-kB expression. Akt is a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) signalling pathway is directly activated by oxidative stress and is altered in AD brains [37]. We found that Akt phosphorylation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was observed in parallel with Tau phosphorylation likely due to the activation of GSK3ß and its dephosphorylation at the serine 9 [38]. Nps-Cur 50:50, as curcumin, treatments efficiently prevented Akt phosphorylation and Tau phosphorylation. These data demonstrated that Nps-Cur 50:50 preserve the ability to regulate the Akt/GSK3ß pathway and Tau phosphorylation [39]. The effects of Nps 50:50 on the phosphorylation of Akt remain to be investigated. The PLGA 50:50 nanoparticles displayed a narrow size distribution ranging from 106 to 216 nm for Nps 50:50 and from 85 to 164 nm for Nps-Cur 50:50. The TEM was used to confirm the nanoparticles size and indicate that the nanoparticles have a spherical morphology. The morphology of Nps 50:50 and Nps-cur 50:50 do not differ from the Nps 65:35 and Nps-Cur 65:35. However, the size of Nps-Cur 50:50 was higher than Nps-Cur 65:65 suggesting that the polymer ratio of lactic acid/glycolic acid interferes on this parameter. The PDI of the Nps-Cur 50:50 is 0.12 and Nps 50:50 is 0.3, indicating that both formulation are monodispersed but the encapsulation of curcumin showed a better uniformity of size distribution than Nps 50:50. The PDI of Nps-Cur 65:35 (0.25) [18], with is higher than Nps-Cur 50:50 (0.12). In the present study, the nanoparticles were positively charged, 6.4 mV for Nps 50:50 and 63 mV for Nps-Cur 50:50. Interestingly, in accordance with the polydispersity study, curcumin encapsulation in the nanoparticles induced an increase of the particle size, resulting on an improvement of particle stability. The amount of drug loading in the drug delivery nanoparticles plays a significant role on the rate and duration of drug release. The polymer composition and the drug entrapment are an important property for drug delivery. This parameter is linked to PLGA concentration, molecular weight, the lactic/glycolic acid ratio and the nature of the stabilizer used [40, 41]. The in vitro release study of Nps-Cur 50:50 is comparable to the Nps-Cur 65:35 and presents a biphasic release profile. The initial exponential phase was probably due to the release of curcumin, which was either close to the surface and/or adsorbed on the surface of the Nps-Cur

50:50. We have previously demonstrated that curcumin release kinetics fits a Higuchi model, suggesting that the slow release phase was due to the diffusion of the dissolved drug within the core of the PLGA of the Nps-Cur 65:35 into the release medium, followed by the degradation of polymer matrix [18]. PLGA 50:50 exhibited a faster degradation rate than PLGA 65:35 likely due to preferential degradation of glycolic acid proportion and higher hydrophobicity. The amount of glycolic acid is a critical parameter in tuning the hydrophobicity of the matrix and thus the degradation and drug release rate [19, 23, 42]. However, our results show that Nps-Cur 50:50 exhibit a slower liberation of curcumin than Nps-Cur 65:35 particularly during the first 30 minutes suggesting a slower degradation rate for PLGA 50:50. These results can be explained by the interaction between curcumin and PLGA [43]. Indeed, it has recently been demonstrated by FTIR and XRD studies that interactions might occur between the encapsulated curcumin and PLGA polymer matrix by a possible formation of intermolecular hydrogen bonds between the curcumin O-H and PLGA C=O [33, 44]. In conclusion, our study demonstrated that curcumin loaded nanoparticules prolonged and enhanced the antioxidant, anti-inflammatory activity of curcumin while suppressing the Akt and Tau phosphorylation under oxidative stress condition. We have also demonstrated the importance of the choice of the polymer composition in drugloaded formulation. Indeed, the ratio of lactic acid /glycolic acid influences the physicoproperties of the nanoparticles, which will consequently impact on the in vivo properties by modulating the drug entrapment percentage and the *in vitro* drug release. To summarize, the curcumin loaded PLGA 50:50 formulation is likely to have a great potential for pharmacological application in neurodegenerative disorders such as AD.

# Legends

Table 1: Data on the particle size, width, entrapment efficacy, PDI and zeta potential for Nps 50:50, Nps-Cur 50:50, Nps 65:35 and Nps-Cur 50:50 analyzed by DLS.

Figure 1: Size and morphological characterization of Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50 using dynamic laser light scattering (DLS) and transmission electron micrograph (TEM). DLS analysis of polymeric Nps 50:50 (A) and Nps-Cur 50:50 (B) and TEM photographs of Nps 50:50 (C) and Nps-Cur 50:50 (D).

Figure 2: Comparison of *in vitro* release kinetics of curcumin from Nps-Cur 65:35 and Nps-Cur 50:50 in 50 % v/v of ethanol at 37°C (A). The figure inserted represents the release kinetic for the first hour. Confocal imaging of nanoparticle uptake by SK-N-SH cells. SK-N-SH cells were treated for 1 h at 37°C with water (control) (B), Nps 50:50 (C), free curcumin (D) and Nps-Cur 50:50 (E). Auto-fluorescence of curcumin is observed in green (D, F). Quantification of the fluorescence (F) with \*\*\*p<0.001 versus Nps-Cur 50:50.

Figure 3: Antioxidant capacity of free curcumin, Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50.

Effects of free curcumin, Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50 on (A) DPPH radical-scavenging activity; (B) Relative fluorescence induced by AAPH; in the presence of 0.5  $\mu$ M of free curcumin; (C) on the intensity of DCF-DA analyzed 1h after the treatment of SK-N-SH cells on the absence or (D) in the presence of 1 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Result are expressed as percentage of control (considered as 100%) with \*\* p< 0 ,01 and \*\*\*p< 0 ,001 versus controls and with <sup>#</sup>p< 0,05 *versus* Nps-Cur 50:50 group. All the assays values data represent ± SEM from at least three separate experiments performed in triplicate.

Figure 4: Effects of free curcumin, Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50 on the antioxidant pathway. After 1h of treatments, the total level of Keap 1 was analyzed on total proteins (A). After 30 min

of treatment, the Nrf2 levels were determined on nuclear fraction (B). Blot represents one of the three independent experiments and bar graph represents quantitative results of the ratio between Keap1 and GAPDH and, Nrf2 and Amido Black. Densitometry analyses were performed on all three experiments. Results are expressed as percentage of control (considered as 100%) with \*p< 0.05 and \*\*p< 0.1 versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated group and with <sup>#</sup> p< 0.05 versus Nps-Cur 50:50 group.

Figure 5: Effects of free curcumin, Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50 on the enzymatically active gelatinase induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Extracellular release of MMP-9 (gelatinase) was evaluated using gelatin zymography experiments and densitometry analysis of gelatinase activity observed in the gels (A). Levels of p50, one of the subunits of NF- $\kappa$ B, were determined in the cytoplasmic (B) and nuclear fractions (C). Blots represent one of three independent experiments and bar graph represents quantitative results of the ratio between p50 and amido black used as protein loading control. Results are expressed as percentage of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (considered as 100%) with \*p< 0,05 versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and with <sup>#</sup> p< 0,05 versus Nps-Cur 50:50 group. For all the assays values data represent ± SEM from at least three separate experiments.

Figure 6: Effects of free curcumin, Nps 50:50 and Nps-Cur 50:50 on Akt and pTau pathways. After 1h of treatment, the level of pAkt (A), and pTau (B) were measured on total proteins. Blots represent one of the three independent experiments and bar graph represents quantitative results between pAkt and GAPDH and pTau with Amido Black. Densitometry analyses were performed on all three experiments. Results are expressed as percentage of control (considered as 100%) with \*\*p< 0.01 and \*\*\*p< 0.001 *versus* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated groups and <sup>#</sup> p< 0.05 *versus* Nps-Cur 50:50 group.

# Acknowledgment

Financial support was obtained from Natural Sciences and Engineering Research Council (to C.R., NSERC) and from Louise & André Charron Chair in Alzheimer's disease.

SD gratefully acknowledges financial support from the Foundation Armand-Frappier.

# References

- 1. Prince, M. and J. Jackson, *World Alzheimer Report 2009*. 2009: Alzheimer's Disease International.
- 2. Russ, T.C. and J.R. Morling, *Cholinesterase inhibitors for mild cognitive impairment*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. 9: p. CD009132.
- 3. Krstic, D. and I. Knuesel, *Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease.* Nat Rev Neurol, 2013. 9(1): p. 25-34.
- 4. Caldeira, G.L., I.L. Ferreira, and A.C. Rego, *Impaired transcription in Alzheimer's disease: key role in mitochondrial dysfunction and oxidative stress.* J Alzheimers Dis, 2013. **34**(1): p. 115-31.
- 5. Singh, M., et al., *Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein.* J Alzheimers Dis, 2010. **21**(3): p. 741-56.
- 6. Christen, Y., Oxidative stress and Alzheimer disease. Am J Clin Nutr, 2000. 71(2): p. 621S-629S.
- 7. Sultana, R. and D.A. Butterfield, Oxidative modification of brain proteins in Alzheimer's disease: perspective on future studies based on results of redox proteomics studies. J Alzheimers Dis, 2013. **33 Suppl 1**: p. S243-51.
- 8. Smith, M.A., et al., Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment. J Alzheimers Dis, 2010. **19**(1): p. 363-72.
- 9. Hudson, G., et al., No consistent evidence for association between mtDNA variants and Alzheimer disease. Neurology, 2012. **78**(14): p. 1038-42.
- 10. Belkacemi, A. and C. Ramassamy, *Time sequence of oxidative stress in the brain from transgenic mouse models of Alzheimer's disease related to the amyloid-beta cascade.* Free Radic Biol Med, 2012. **52**(3): p. 593-600.
- 11. Ringman, J.M., et al., Oral curcumin for Alzheimer's disease: tolerability and efficacy in a 24-week randomized, double blind, placebo-controlled study. Alzheimers Res Ther, 2012. 4(5): p. 43.
- 12. Belkacemi, A., et al., *Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease*. Expert Rev Mol Med, 2011. **13**: p. e34.
- 13. Doggui, S., et al., Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways. Mol Nutr Food Res, 2013.
- 14. Dang, T.N., et al., Molecular regulations induced by acrolein in neuroblastoma SK-N-SH cells: relevance to Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, 2010. 21(4): p. 1197-216.
- 15. Dang, T.N., et al., Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. Curr Mol Pharmacol, 2010. 3(2): p. 66-78.
- Lovell, M.A., C. Xie, and W.R. Markesbery, Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. Neurobiol Aging, 2001. 22(2): p. 187-94.

- 17. Williams, T.I., et al., Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, 2006. 27(8): p. 1094-9.
- 18. Doggui, S., et al., Neuronal uptake and neuroprotective effect of curcuminloaded PLGA nanoparticles on the human SK-N-SH cell line. J Alzheimers Dis, 2012. 30(2): p. 377-92.
- Makadia, H.K. and S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Polymers (Basel), 2011. 3(3): p. 1377-1397.
- 20. Tsai, Y.M., et al., Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration. Int J Pharm, 2011. 416(1): p. 331-8.
- 21. Tiwari, S.K., et al., Curcumin-loaded nanoparticles potently induce adult neurogenesis and reverse cognitive deficits in Alzheimer's disease model via canonical Wnt/beta-catenin pathway. ACS Nano, 2014. 8(1): p. 76-103.
- 22. Lu, L., et al., In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-coglycolic acid) foams. Biomaterials, 2000. 21(18): p. 1837-45.
- 23. Park, T.G., Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. Biomaterials, 1995. 16(15): p. 1123-30.
- 24. Houchin, M.L. and E.M. Topp, *Physical Properties of PLGA Films During Polymer Degradation*. Journal of Applied Polymer Science, 2009. **114(5)**: p. 2848-2854.
- 25. Mohanty, C. and S.K. Sahoo, *The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics* of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. Biomaterials, 2010. **31**(25): p. 6597-611.
- Gu, L., et al., Chemical and cellular antioxidant activity of two novel peptides designed based on glutathione structure. Food and Chemical Toxicology, 2012. 50(11): p. 4085-4091.
- 27. Ou, B., M. Hampsch-Woodill, and R.L. Prior, *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe.* J Agric Food Chem, 2001. **49**(10): p. 4619-26.
- 28. Davalos, A., C. Gomez-Cordoves, and B. Bartolome, *Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay.* J Agric Food Chem, 2004. **52**(1): p. 48-54.
- Kakkar, V., et al., Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin. Molecular Nutrition & Food Research, 2011. 55(3): p. 495-503.
- 30. Cao, G., H.M. Alessio, and R.G. Cutler, *Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants.* Free Radic Biol Med, 1993. **14**(3): p. 303-11.
- Candelario-Jalil, E., Y. Yang, and G.A. Rosenberg, Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. Neuroscience., 2009. 158(3): p. 983-94. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.025. Epub 2008 Jun 19.
- 32. Lockman, P.R., et al., *Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier*. Drug Dev Ind Pharm, 2002. **28**(1): p. 1-13.

- 33. Xie, X., et al., *PLGA nanoparticles improve the oral bioavailability of curcumin in rats: characterizations and mechanisms.* J Agric Food Chem, 2011. **59**(17): p. 9280-9.
- 34. Loo, J.S., C.P. Ooi, and F.Y. Boey, *Degradation of poly(lactide-co-glycolide)* (*PLGA*) and poly(*L*-lactide) (*PLLA*) by electron beam radiation. Biomaterials, 2005. **26**(12): p. 1359-67.
- 35. Mattson, M.P., *Pathways towards and away from Alzheimer's disease*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 631-639.
- 36. Buhrmann, C., et al., *Curcumin modulates nuclear factor kappaB (NF-kappaB)*mediated inflammation in human tenocytes in vitro: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. J Biol Chem, 2011. **286**(32): p. 28556-66.
- Jimenez, S., et al., Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (Abeta) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model. J Biol Chem., 2011.
  286(21): p. 18414-25. doi: 10.1074/jbc.M110.209718. Epub 2011 Apr 1.
- Feng, Y., et al., Cleavage of GSK-3beta by calpain counteracts the inhibitory effect of Ser9 phosphorylation on GSK-3beta activity induced by H(2)O(2). J Neurochem., 2013. 126(2): p. 234-42. doi: 10.1111/jnc.12285. Epub 2013 May 30.
- 39. Ma, Q.-L., et al., *Curcumin suppresses soluble tau dimers and corrects molecular chaperone, synaptic, and behavioral deficits in aged human tau transgenic mice.* Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(6): p. 4056-4065.
- 40. Song, X., et al., *Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **69**(2): p. 445-453.
- 41. Wischke, C. and S.P. Schwendeman, *Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles.* International Journal of Pharmaceutics, 2008. **364**(2): p. 298-327.
- 42. Shive, M.S. and J.M. Anderson, *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. **28**(1): p. 5-24.
- 43. Frank, A., S.K. Rath, and S.S. Venkatraman, *Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition*. J Control Release, 2005. **102**(2): p. 333-44.
- 44. Chereddy, K.K., et al., *Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity*. Journal of Controlled Release, 2013. **171**(2): p. 208-215.

# Table 1

Formulation name	Weight ration of drug to polymer (%)	Drug Entrapment (%)	Size (d.nm)	Width (d.nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
Nps 50:50	-	-	161,6 ± 1,6	55,33 ± 12,8	0,30 ±0,013	6,4 ± 0,3
Nps-Cur 50:50	15	80 ± 9,01	124,9 ± 31,5	39 ± 6,2	0,12 ± 0,045	63 ± 3,9
Nps 65:35	-	-	100	20	0,25	26 ± 8,2
Nps-Cur 65:35	15	31	100	20	0,25	55 ± 5

Figure 1

















B) Keap1 A) Nrf2 W/weeks GAPDH 350 Nuclear Nrf2/ Amido black (% of control ± SEM) 250 300 # # 250 Keap1/GAPDH ratio (% of control ± SEM) \*\* \*\* 200 T 200 150 150 \*\* \*\* 100 100 50 50 0 curcumin Nps 50:50 Nps-Cur control H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50:50 0 Nps 50:50 Control  $H_{2}O_{2}$ curcumin Nps-Cur 50:50 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>0<sub>2</sub> A) MMP-9 Figure 5 160 140 120 Arbitrary unit 100 80 60 40 20 G Nps 50.50 Nps-Cur  $H_2O_2$ curcumin 50:50 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> C) Nuclear Fraction B) Cytoplasmic Fraction 324 600 600 P50/Amido Black ratio % of controlt SEM 005 005 005 006 009 009 P50/Amise Black ratio % of control 1 SEM} 00 00 00 00 00 00 00 00 00 \*\* \*\*\* \*\*\* \*\*\* 100 \*\* D D  $H_{2}O_{2}$ Nps-Cur Control curcumin Nps Nps-Cur Control curcumin Nps H<sub>z</sub>O<sub>z</sub> 50.50

Figure 4

162

+ H<sub>2</sub>0<sub>2</sub>

50.50

+ H<sub>2</sub>0<sub>2</sub>

Figure 6



# 2.2.4 Conclusion de l'article 2

À l'aide de la méthode d'émulsion-évaporation de solvant, nous avons préparé les Nps 50:50 et Nps-Cur 50:50. Suite à ce type de préparation, leurs propriétés physicochimiques ont été caractérisées et comparées à celles des nanoparticules composées de PLGA 65:35.

Les résultats obtenus au DLS (taille, PDI et potentiel zêta) montrent que la distribution de la taille des Nps-Cur 50:50 est **homogène** et que la formulation est **monodispersée**. De plus, les valeurs du potentiel zêta nous indiquent que les particules sont **chargées positivement** ce qui pourrait permettre une meilleure internalisation par les cellules (chargées négativement). La comparaison entre la valeur absolue du zêta potentiel des Nps-Cur 50:50 et les Nps 50:50 suggère que l'encapsulation du curcumin stabilise les nanoparticules c'est dire que les Nps-Cur seront moins susceptibles de s'agréger. L'augmentation de la stabilité des Nps-Cur 50:50 peut s'expliquer par les **interactions hydrophobes** entre le PLGA et le curcumin [486]. En effet, il a été récemment montré par FTIR que le curcumin encapsulé ne présente pas de bandes caractéristiques de la liaison O-H suggérant la formation intramoléculaire d'un pont hydrogène entre le groupement O-H du curcumin et le groupement C=O du PLGA. Ces résultats ont été confirmés par XRD, par l'absence du signal caractéristique de la forme cristalline du curcumin [563, 564]. Cependant, plus d'études sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes d'interaction sous-jacents entre le PLGA et le curcumin.

La comparaison des Nps-Cur 65:35 et des Nps-Cur 50:50 démontre que leur morphologie et leur taille sont similaires. On peut cependant, noter une légère augmentation de la taille des Nps-Cur 50:50 même si elle est non significative. Cette observation pourrait s'expliquer par **l'augmentation du pourcentage d'encapsulation** du curcumin passant de 31% pour les Nps-Cur 65:35 à 81% pour les Nps-Cur 50:50. Il a été montré que le pourcentage d'encapsulation du curcumin par les nanoparticules composé de PLGA 50:50 peut atteindre plus de 90% [563]. Cette différence peut-être expliquée par le stabilisateur utilisé (solvant aqueux). Dans le cas présent, nous avons utilisé le DMAB alors que dans la majorité des études le stabilisateur utilisé est le PVA [563]. Assurément, le DMAB possède de nombreux avantages par rapport au PVA car il permet la synthèse de nanoparticules de petite taille et charge positivement les
nanoparticules augmentant ainsi leur temps de rétention à la surface des cellules et par conséquent d'augmenter l'internalisation cellulaire [565, 566].

Le PDI est un paramétre important à considérer, car il indique l'homogénéité de la distribution de la taille. Les valeurs du PDI sont comprises entre 0 et 1 avec 0 correspondant à une formulation monodispersée. L'utilisation de PLGA 50:50 permet de réduire considérablement la valeur du PDI passant de 0.25 pour les Nps-Cur 65:35 à 0.12 pour les Nps-Cur 50:50. Ces résultats suggèrent donc que la composition de la matrice polymérique serait un facteur influençant l'homogénéité de la taille.

L'étude *in vitro* du relargage des Nps-Cur 50:50 présente un profil de **relargage biphasique** comparable aux Nps-Cur 65:35. La phase initiale exponentielle est probablement due à la libération du curcumin adsorbé ou proche de la surface externe des nanoparticules alors que la phase de libération lente serait du à la libération du curcumin qui se trouve au centre des nanoparticules. Nous avons montré dans l'article 1 que la cinétique de curcumin suit le modèle d'Higuchi suggérant que la phase de libération lente du curcumin serait causée par la diffusion du curcumin à travers la matrice polymérique suivie de la dégradation de cette dernière. Il est important de souligner que les **Nps-Cur 50:50 libèrent plus lentement le curcumin** que les Nps-Cur 65:35 pendant les 30 premières minutes suggérant ainsi l'importance de la matrice polymérique dans la synthèse de nanoparticules à visées thérapeutiques.

Nous avons également démontré par microscopie confocale que l'encapsulation du curcumin par les Nps-Cur 50:50 augmente **4,4 fois** l'internalisation du curcumin au niveau du cytoplasme et du noyau comparé au curcumin libre. L'augmentation intracellulaire du curcumin peut s'expliquer par le fait que les nanoparticules protègent le curcumin de sa dégradation dans le milieu de culture et augemente sa solubilité apparente dans le milieu de culture permettant ainsi sa libération dans le milieu de culture et son absportion passive par la membrane plasmique des cellules SK-N-SH. La présence du curcumin au niveau péri-nucléaire et nucléaire permet de souligner son effet sur la synthèse de protéines ou de facteurs de transcriptions impliqués dans la

protection cellulaire contre le stress oxydatif. Compte tenu de résultats précédents, nous nous sommes intéressés plus précisément aux mécanismes biologiques induits par les Nps-Cur 50:50.

L'un des facteurs les plus importants à considérer dans la synthèse des nanoparticules utilisés à des fins thérapeutiques est la toxicité cellulaire. Nous avons démontré dans un premier temps que les Nps 50:50 et les Nps-Cur 50:50 sont non toxiques pour les cellules SK-N-SH (Figure 17).



Figure 17 Effets des Nps 50 :50 et Nps-Cur 50 :50 sur la survie et la mortalité des cellules SK-N-SH.

Trois différentes concentrations  $(0.07\mu M, 0.25\mu M \text{ et } 0.5\mu M)$  de curcumin libre, de Nps-Cur 50:50 et de volume équivalent de Nps 50 :50 ont été analysés sur la mortalité cellulaire par le test de la LDH (A) et sur la survie cellulaire par le test du Résazurin (B). Les contrôles sont considérés comme 100%

Contrairement aux Nps-Cur 65:35 (0,07  $\mu$ M), les résultats obtenus au test du Résazurin montrent que les Nps-Cur 50:50 (0,5  $\mu$ M) n'altèrent pas le métabolisme cellulaire basal et cela malgré une concentration 7 fois plus élevée de curcumin encapsulé. Afin de déterminer si les propriétés antioxydantes du curcumin sont modifiées par l'encapsulation, nous avons évalué la capacité antioxydante du curcumin encapsulé à piéger des radicaux libres. Les résultats obtenus au test de l'ORAC suggèrent que l'encapsulation du curcumin par les nanoparticules de PLGA 50:50 augmente sa capacité antioxydante de 1,5 fois. Les Nps-Cur 50:50 protègent également les cellules SK-N-SH contre le stress oxydatif induit par l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Afin d'étudier en profondeur l'effet neuroprotecteur des Nps-Cur 50:50, nous avons ciblé trois voies de signalisation activées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et connues pour être régulées par le curcumin : 1) la voie antioxydante Keap1/Nrf2, 2) la voie de l'inflammation NF-κB et 3) la voie de survie cellulaire pAkt/pGSK3/pTau.

Nous avons choisi d'étudier la voie de signalisation Nrf2, car elle joue un rôle primordial dans le contrôle du potentiel redox en se liant aux éléments de réponses antioxydantes et aux enzymes de phase 2 qui régulent l'expression des gènes antioxydants. Les résultats obtenus pour les Nps-Cur 50:50 sont comparables aux Nps-Cur 65:35 et suggèrent que l'encapsulation du curcumin maintient son effet sur cette voie de signalisation.

Nous nous sommes ensuite interessés, à l'action des Nps-Cur 50:50 sur la modulation du **facteur de transcription NF-\kappaB** qui est bien connu pour ses effets pro-inflammatoires en induisant la production de cytokines inflammatoires et l'inflammation chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer via la régulation de protéines invasives telle que MMP-9. Les résultats obtenus démontrent que les Nps-Cur 50:50 réduisent l'expression de NF- $\kappa$ B et de MMP-9 avec une meilleure efficacité que le curcumin libre.

La voie de signalisation Akt est une voie centrale dans la maladie d'Alzheimer, car elle aboutit à la phosphorylation de la protéine Tau. Nous avons montré que les Nps-Cur 50 :50 et le curcumin protègent de la phosphorylation de Akt et de Tau induite par le  $H_2O_2$ . Il est surprenant de noter qu'aucun effet n'est observé par le curcumin ou les Nps-Cur 50:50 sur la phosphorylation de GSK3 induite par le  $H_2O_2$  (Figure 18). L'hypothèse que nous pouvons émettre afin d'expliquer ce résultat est que la concentration et le temps de traitement ne sont pas optimums pour détecter l'effet du curcumin sur l'inhibition de la kinase GSK3. En effet, il a été montré dans la littérature que l'inhibition de GSK3 par le curcumin est dépendante du temps de traitement et de sa concentration [567].



Figure 18 Effet du curcumin libre, des Nps 50 :50 et Nps-Cur 50 :50 sur la protéine GSK3.

Après 1h de traitement, le niveau de pGSK3- $\beta$  est mesuré sur les protéines totales. Le blot choisi correspond à l'une des trois expériences réalisées indépendamment. Le graphique représente les résultats qualitatifs entre pGSK3- $\beta$  et Amido Black. L'Amido Black est utilisé en tant que témoin de charge. La densitométrie a été réalisée sur au moins trois expériences. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (considéré comme 100%) avec \*\*p< 0.01 versus groupe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ainsi, nous avons montré que le curcumin et les Nps-Cur 50:50 protègent efficacement les cellules neuronales contre le stress oxydatif induit par le  $H_2O_2$ . En nous basant sur ces résultats, nous nous sommes ensuite intéressés à leurs effets sur l'acroléine (sous produit très réactif de la peroxydation lipidique). Comme le  $H_2O_2$ , l'acroléine est un inducteur du stress oxydatif, mais il plus toxique que l'  $H_2O_2$  [147, 155, 568]. Nous avons montré d'une part que le curcumin protège les cellules SK-N-SH de la toxicité induite par l'acroléine en bloquant l'activation des voies de signalisation : antioxydante (Keap1/Nrf2), anti-inflammatoire (NF- $\kappa$ B), et de survie cellulaire (Sirt1 et Akt) [568]. D'autre part, nous avons démontré que les nanoparticules 50:50 permettaient d'augmenter l'efficacité du curcumin en comparaison au curcumin libre contre la mortalité induite par l'acroléine et cela à une concentration 10 fois plus inférieure (Annexe1).

Dans le chapitre suivant, nous allons développer et critiquer les points de discussion mentionnés dans les conclusions des articles 1 et 2.

### **3 DISCUSSION**

Le vieillissement de la population s'accompagne de l'augmentation rapide des maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer. Cependant, l'efficacité des traitements qui ciblent le cerveau est limitée par : leur faible solubilité et biodisponibilité, leur rapide dégradation ainsi que leur transport à travers la barrière hémato-encéphalique. Comme détaillé précédemment les traitements actuels de la maladie d'Alzheimer causent de nombreux effets secondaires périphériques qui poussent souvent les patients à arrêter le médicament. Ainsi, le développement de traitements efficaces contre la maladie d'Alzheimer reste un grand défi et une voie active de recherche. Afin de développer de nouvelles stratégies pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, il est important de prendre en considération que cette pathologie est multifactorielle. De plus, il est maintenant bien établi que le stress oxydatif n'est pas seulement une conséquence de la maladie, mais contribue aussi à sa physiopathologie de façon précoce. C'est pourquoi les antioxydants tels que les polyphénols pourraient être des composés prometteurs dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Dans cette thèse nous nous sommes spécifiquement intéressés au curcumin car ce composé possède une activité pléiotropique ciblant de nombreux mécanismes impliqués dans la maladie d'Alzheimer (antioxydant, antiinflammatoire, anti-A $\beta$  et anti-phosphorylation de la protéine Tau) [389]. Cependant, les études cliniques et précliniques ont souligné des limitations de son activité thérapeutique. Celles-ci seraient causées par son caractère hydrophobe dans les milieux aqueux réduisant sa biodisponibilité systémique lors de son administration par voie orale et également par sa faible absorption au niveau du tractus gastro-intestinal [569]. Ainsi, la question fondamentale qui en découle et sur laquelle est basé ce projet de doctorat est :

#### Comment améliorer la solubilité, la stabilité et la biodisponibilité du curcumin?

Pour répondre à cette question, notre approche a été d'encapsuler le curcumin dans des nanoparticules composées d'une matrice polymérique et biodégradable de PLGA. En effet,

depuis les dix dernières années de nombreuses études ont montré que l'encapsulation de composés biactifs dans des nanoparticules de PLGA permettait de lutter contre leur dégradation prématurée, d'améliorer leur solubilité apparente et leur biodisponibilité systémique. Ainsi, nous avons trois objectifs à réaliser: 1) synthétisé et caractérisé les nanoparticules avec et sans curcumin ; 2) évalué *in vitro* les effets toxiques ou protecteurs des nanoparticules, l'efficacité de l'encapsulation du curcumin et leur distribution cellulaire ; et 3) étudier l'influence de la composition du polymère sur le pourcentage d'encapsulation, le relargage et l'absorption cellulaire.

Nos travaux suggèrent que l'encapsulation du curcumin dans des nanoparticules de PLGA augmente sa solubilité apparente, sa stabilité dans le milieu de culture et, par conséquent, sa biodisponibilité. Les résultats mis en évidence dans cette thèse soutiennent également l'idée que l'encapsulation du curcumin dans les nanoparticules de PLGA maintient les effets du curcumin sur différentes voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de protection contre le stress oxydatif. Dans ce chapitre, nous allons donc discuter les résultats obtenus, les questions qu'ils entrainent et les projets menés dans notre laboratoire qui visent à approfondir ces travaux. En effet, afin de développer des nanoparticules encapsulant des composés bioactifs plusieurs questions doivent être approchées:

- Est-ce que la composition du polymère influence la stabilité et la biodisponibilité du composé?
- Est-ce que la méthode de synthèse influence les interactions polymère-composé encapsulé?
- Est-ce que les propriétés physico-chimiques des nanoparticules influencent leur internalisation cellulaire, l'encapsulation du composé bioactif et sa libération?

#### 3.1 Optimisation des nanoparticules de PLGA encapsulant le curcumin

Les expériences réalisées dans cette thèse sont basées sur le développement et la mise au point d'un outil permettant le transport d'un composé bioactif telles que le curcumin à travers les différentes barrières biologiques de l'organisme. Or, l'utilisation de nanomatériaux en recherche biomédicale et en médecine nécessite une évaluation attentive et poussée de leurs propriétés physico-chimiques afin de mieux comprendre leurs mécanismes biologiques intrinsèques et leur biodistribution après leur administration dans l'organisme.

Le premier facteur à considérer dans la mise au point de nanoparticules est le choix du polymère utilisé. En effet, la nature de la surface des nanoparticules doit permettre d'augmenter leur stabilité dans les milieux biologiques et leur biocompatibilité. Dans notre étude, nous avons choisi le PLGA, car c'est un polymère hydrophobe biodégradable et biocompatible utilisé depuis des années pour de nombreuses applications biomédicales et approuvé par la FDA [467, 471, 498]. En effet, le PLGA est régulièrement utilisé dans le domaine chirurgical, car il entre dans la composition : des fils de sutures résorbables (suture Vicryl<sup>®</sup> et PANACRYL<sup>®</sup>), de matériaux utilisés dans la régénération tissulaire et la greffe de peau (Vicryl Mesh<sup>®</sup>, Dermagraft<sup>®</sup>, CYTOPLAST Resorb<sup>®</sup>) [471]. De plus, le mécanisme de dégradation de ce polymère a été largement étudié. En effet, le PLGA est, dans un premier temps, hydrolysé en ses deux monomères, l'acide lactique et l'acide glycolique qui vont ensuite entrer dans le cycle de Krebs où ils vont être métabolisés puis éliminés de l'organisme sous forme de CO<sub>2</sub> et d'eau [570]. Il a été montré que la vitesse de dégradation du PLGA dépend principalement de la quantité d'acide glycolique (monomère le plus hydrophile) [485]. Le PLGA 50:50 est composé de 50% acide lactique et 50% acide glycolique alors que le PLGA 65:35 est composé de 65% acide lactique et 35% acide glycolique. Cela signifie que la quantité d'acide glycolique du PLGA 50:50 est supérieure à celle du PLGA 65:35. Donc le PLGA 50:50 serait plus hydrophile et se dégraderait plus rapidement que le PLGA 65:35, suggérant que la libération du curcumin se ferait plus rapidement. Dans le cas présent, nous voulons un relargage lent du curcumin c'est pourquoi nous avons choisi le PLGA 65:35 pour faire la mise au point de la formulation.

Le second facteur à prendre en considération est le choix de la méthode de préparation, car elle doit être parfaitement reproductible et peu couteuse. Les nanoparticules de PLGA ont été synthétisées à l'aide de la méthode d'émulsion-évaporation de solvant. Elle dépend principalement du type de composé à encapsuler. De plus, elle influence les propriétés physicochimiques des particules (e.g. la taille, la stabilité, la cinétique de relargage et l'internalisation cellulaire). D'autre part, cette technique permet la synthèse de formulation flexible permettant de modifier facilement certains paramètres tels que la composition du polymère, la nature du surfactant ou la taille des particules, sans altérer la stabilité de la formulation. Compte tenu de la reproductibilité de la méthode et le fait qu'elle permet le contrôle de la taille des nanoparticules, il semblerait qu'elle soit donc très intéressante pour une transposition industrielle. Cependant, afin d'avoir des résultats reproductibles et optimaux, il est important de considérer les possibles variations inter-formulation.

Une fois les nanoparticules préparées, il est indispensable de déterminer leurs **propriétés physico-chimiques** (e.g. la taille, l'index de polydispersité et le potentiel zêta) qui vont influencer leur internalisation cellulaire, l'encapsulation du composé bioactif et sa libération.

# 3.2 Comparaison des propriétés physico-chimiques des Nps-Cur 65:35 et des Nps-Cur 50:50

Propriétés physico-chimiques	Nps-Cur 65 :35	Nps-Cur 50 :50		
Taille moyenne (nm)	100	125		
Distribution moyenne de la taille (nm)	80-120	85-165		
Morphologie	Régulière et sphérique	Régulière et sphérique		
Indice de polydispersité	0,25	0,12		
Potentiel zêta	$55 \pm 5 \text{ mV}$	63 ± 3.9 mV		
Stabilité	6 mois	Non déterminé		

Fableau (	3-1	comparaison (	des pro	nriétés i	ohy	sicochimia	ues des	Nns-C	ur 6	5:35 e	et des	Nps-	Cur	50:	50
Labicau.	)- I	comparation v	uca pro	prices	, J	Sicocuming	acs acs	Tiho.c	ui v.	0.000	e uco	riha.	Cui		20

% d'encapsulation du curcumin	31 %	81 %
Profil de relargage du curcumin	Biphasique	Biphasique

L'ensemble des propriétés physicochimiques des deux formulations a été résumé dans le tableau 3-1. Les deux types de nanoparticules ont été préparés sous la forme de nanosphères, c'est-à-dire que le curcumin est encapsulé au cœur de la matrice polymérique de PLGA et/ou adsorbé à la surface des nanoparticules. Leur morphologie est sphérique et régulière. Il est intéressant de noter qu'aucune différence significative du diamètre des formulations n'a été démontrée. Cependant, la taille des Nps-Cur 50:50 (125 nm) est légèrement plus élevée que celle des Nps-Cur 65:35 (100 nm). Or, le pourcentage d'encapsulation des Nps-Cur 50:50 est supérieur au Nps-Cur 65:35. Cela suggère que l'augmentation de la quantité de curcumin encapsulé influence la taille des nanoparticules et que ce paramètre varie en fonction de la composition du polymère. Cette observation est en accord avec d'autres études, dont celle de Jeffery et collaborateurs, qui ont démontré que la taille des nanoparticules de PLGA encapsulant de l'ovalbumine dépende de différents paramètres dont l'efficacité de l'encapsulation, et du degré d'hydrophobicité de PLGA [571, 572]. La taille des nanoparticules est un paramètre très important à évaluer, car elle va influencer la toxicité cellulaire et leur internalisation à travers les différentes barrières biologiques particulièrement lors de leur administration par voie orale. Les nanoparticules de PLGA 65:35 et 50:50 que nous avons préparées ont une taille inférieure à 200 nm, cette taille leur permet de traverser les cellules M présentes au niveau des plaques de Peyer [573, 574].

Par ailleurs, **l'indice de polydispersité** des deux formulations est inférieur ou égal à 0,3, ce qui suggère donc une distribution homogène de leur taille. Ces résultats signifient que la quantité de curcumin encapsulée dans chaque nanoparticule est similaire. Ainsi, la concentration de curcumin libérée par les nanoparticules dans chaque cellule sera la même. Il est intéressant de noter que les Nps-Cur 50:50 (0,12) ont un indice de polydispersité inférieur à celui des Nps-Cur 65:35 (0,25). Or, le facteur qui diffère entre les deux types de nanoparticules est l'augmentation du taux d'acide glycolique démontrant ainsi le rôle important des interactions entre ce monomère et le curcumin dans l'homogénéité de taille.

Le potentiel zêta des Nps-Cur 50:50 est positif et supérieur à 30 mV, ce qui suggère que la formulation est stable (Tableau 3-1). Ce potentiel électrochimique varie en fonction du polymère utilisé. Dans le cas du PLGA, la présence de groupements carboxyles libres qui peuvent être chargés en surface des nanoparticules confère une charge négative [575]. Cette charge peut être influencée par la longueur de la chaine polymérique et par le surfactant (stabilisateur) utilisé. Nous avons choisi le DMAB comme surfactant, car il permet de modifier la charge négative des nanoparticules en une charge positive et de réduire la taille des nanoparticules augmentant ainsi leurs interactions cellulaires [565]. Cependant, la majorité des études utilisent le PVA comme surfactant lors de la synthèse des nanoparticules de PLGA, car il permet d'augmenter l'efficacité d'encapsulation. Ainsi, la nature chimique des nanoparticules est différente ce qui rend plus difficile la comparaison des Nps-Cur 50:50 avec d'autres nanoparticules [576, 577].

L'utilisation du PLGA 50:50 a permis d'augmenter le **pourcentage d'encapsulation** du curcumin de près de 2,5 fois par rapport au PLGA 65:35. Ce paramètre peut être modulé uniquement lors de la synthèse des nanoparticules. Il peut être influencé par différents facteurs, dont la nature du polymère tel que nous l'avons démontré dans le chapitre 2.2 L'augmentation du pourcentage du curcumin encapsulé peut soit provenir de l'augmentation du curcumin encapsulé (dépend de la nature du polymère) et/ou de l'augmentation du curcumin adsorbé à la surface du polymère (dépend de l'affinité PLGA-curcumin) [469]. Bien qu'il soit souhaité que la concentration de curcumin encapsulé soit élevée dans le but de réduire la quantité de composés administrés aux patients, une trop forte surcharge pourrait augmenter l'agrégation des nanoparticules et par conséquent bloquer la libération du curcumin par les nanoparticules [463, 491, 493, 532].

De nombreux paramètres peuvent influencer la **libération du curcumin** par les nanoparticules de PLGA. Dans le cas présent, les résultats obtenus indiquent que la nature du polymère est l'un des paramètres principaux. La libération du curcumin par les Nps-Cur 65:35 et Nps-Cur 50:50 suivent un profil biphasique avec une phase de relargage rapide exponentielle et

une phase de relargage plus lente. La phase initiale correspondrait probablement à la libération du curcumin qui se trouve proche de la surface externe ou adsorbé à la surface des nanoparticules. La phase de relargage lente serait due à la libération du curcumin se trouvant au cœur des nanoparticules [463]. Des études ont montré que le relargage du curcumin serait causé par sa diffusion à travers la matrice polymérique et par la dégradation du PLGA [463, 578]. Les Nps-Cur 65:35 libèrent 74 % de leur contenu pendant les 6 premières heures et 50 % au bout de 48 heures alors que les Nps-Cur 50:50 libèrent 35 % de leur contenu au bout de 6 heures et la libération se stabilise au cours des 48 heures suivantes. De plus, durant les 30 premières minutes, la vitesse de relargage des Nps-Cur 50:50 est beaucoup plus lente et progressive que les Nps-Cur 65:35. Or, on s'attendait au résultat inverse, car la concentration de l'acide glycolique (le monomère le plus hydrophile) est plus élevée. Donc le PLGA 50 :50 aurait dû être plus susceptible à l'hydrolyse que le PLGA 65:35. Cependant, lors de la réalisation de nos calculs nous n'avons pas pris en considération le pourcentage d'encapsulation du curcumin dans les diffentes nanoparticules ce qui aurait permis d'ajuster la concentration de curcumin libérer par les 2 types de nanoparticules. Ce facteur sera pris en compte dans nos prochaines études.

Par ailleurs, de nombreuses hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer la différence de vitesse de libération du curcumin par les deux types de nanoparticules :

- L'augmentation de la cristallinité du PLGA via l'augmentation de la quantité d'acide lactique, induirait une réduction de l'hydrolyse du PLGA en bloquant la pénétration de l'eau dans la matrice polymérique [463, 579, 580].

- La modification de la distribution spatiale du curcumin pourrait influencer sa libération. En effet, il se pourrait que le curcumin soit adsorbé en plus grosse quantité à la surface des Nps-Cur 65:35, alors qu'il se trouve encapsulé en plus grosse quantité dans le cœur des Nps-Cur 50:50.

- La teneur en acide glycolique augmente le caractère hydrophile du PLGA et augmenterait, par conséquent, son hydrolyse. Néanmoins, cette hypothèse n'est pas applicable dans notre cas, car on observe le phénomène inverse.

- L'hypothèse la plus probable, dans le cas présent, serait la présence d'interactions hydrophobes entre le curcumin et le PLGA [486]. En effet, la technique du spectromètre FT-IR et celle de la diffraction des rayons X (XRD) ont permis de mettre en évidence une possible interaction entre le curcumin et le PLGA [563]. Le spectre FT-IR présente une bande

caractéristique du groupement O-H du curcumin [563]. Lorsque le curcumin est encapsulé dans les nanoparticules de PLGA, cette bande n'apparaît pas. Ce résultat a été confirmé par XRD qui ne présente pas de réponse caractéristique du curcumin sous sa forme cristalline [563]. Ces résultats suggèrent donc des interactions intramoléculaires qui pourraient s'expliquer par la formation d'une liaison hydrogène entre le groupement O-H du curcumin et le groupement C=O du PLGA. Toutefois, plus d'études seront nécessaires pour comprendre les mécanismes d'interaction de ces deux composés [564].

Il est important de noter que de nombreux paramètres influençant la distribution cellulaire des nanoparticules sont encore mal compris. Une explication possible serait leur inadéquate caractérisation. En effet, malgré la disponibilité de nombreuses méthodes, particulièrement pour la détermination de la taille et de l'agrégation des nanoparticules (facteurs limitants leur ciblage vers le cerveau), elles ne sont pas totalement satisfaisantes. Ainsi, la combinaison d'au moins deux méthodes est nécessaire, incluant la microscopie [504]. L'étude du relargage in vitro du curcumin par la méthode de la dialyse possède également des limitations. En effet, afin de reproduire les conditions physiologiques, la cinétique de relargage devrait être réalisée dans les mêmes conditions, c'est-à-dire à 37°C et pH 7.4. Or, le curcumin est un composé hydrophobe donc afin de permettre sa diffusion à travers la membrane de la dialyse, le sac à dialyse est placé dans une solution 50 % éthanol/eau ce qui pourrait fausser la cinétique de relargage. Une solution permettant de contourner cette limitation méthodologique serait d'étudier la libération du curcumin à partir des nanoparticules en suspension dans les conditions physiologiques. Le curcumin libéré serait séparé du curcumin encore encapsulé par des centrifugations successives. Ensuite, le pourcentage de libération du curcumin serait analysé dans les différents surnageants récoltés [581].

Compte tenu du pourcentage d'encapsulation du curcumin et de la cinétique *in vitro* des Nps-Cur 50:50, nous utiliserons le PLGA 50:50 pour nos études futures.

# 3.3 La compréhension des interactions cellules-nanoparticules, un passage nécessaire à leur utilisation à des fins thérapeutiques.

L'importance du choix du modèle cellulaire :

Les études *in vitro* sont particulièrement pertinentes pour étudier la toxicité cellulaire, l'efficacité biologique du composé encapsulé et la localisation subcellulaire des nanoparticules. Elles nécessitent cependant, l'utilisation d'un modèle cellulaire adéquat, c'est-à-dire un modèle prédictif des mécanismes humains et reproductible. Bien que l'utilisation de cultures primaires de neurones [582], de neurones humains immortalisés (LAN-5) [583] et de cellules souches pluripotentes induites (récemment développées) [584] soit intéressante, elles posent de nombreux problèmes tels que la biopsie de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, le taux élevé de mortalité cellulaire, la faible reproductibilité et la forte variabilité neuronale [585]. C'est pourquoi pour réaliser notre étude, nous avons choisi les cellules de neuroblastomes humains, les SK-N-SH. Ces cellules ont été développées par Biedler et ses collaborateurs en 1973. Leur utilisation représente de nombreux avantages, car elles sont d'origine humaine, se différencient en neurones matures et sont sensibles à de nombreux facteurs (manque de sérum, toxicité induite par l'Aß et au stress oxydatif) [586, 587]. De plus, ce qui rend particulièrement intéressante l'utilisation de cette lignée comme modèle cellulaire pour l'étude de maladies neurodégénératives c'est leur forte activité dopamine-β hydroxylase (enzyme distribuée uniquement dans le système nerveux sympathique) et acétylcholinestérase [588].

#### Étude de la toxicité cellulaire des nanoparticules de PLGA encapsulant le curcumin

En vue de l'utilisation clinique des nanoparticules de PLGA, il est important de considérer leur cytotoxicité. Les études de toxicité cellulaire permettent de déterminer la dose efficace et non toxique ainsi que le temps de traitement. Dans le cas présent, les cellules SK-N-SH ont été incubées durant une période de temps prédéterminée en présence d'une concentration croissante de nanoparticules à 37°C. Ensuite, les tests de mortalité (mesure du relargage de la LDH) et de survie (résazurin) cellulaire ont été réalisés, en comparaison avec les cellules non-traitées. Les résultats de la mortalité cellulaire obtenus démontrent que ni les nanoparticules de PLGA 65:35 ni celles 50:50 sont toxiques. Cependant, le test du résazurin prouve que les nanoparticules de PLGA 65:35 (Nps 65:35 et Nps-Cur 65:35) diminuent l'activité métabolique des cellules SK-N-SH. Il est intéressant de noter qu'aucun effet des nanoparticules de PLGA 50:50 n'est observé au test du résazurin malgré l'utilisation d'une concentration sept fois plus élevée que celle des nanoparticules de PLGA 65:35. Ces résultats suggèrent donc que la matrice

polymérique influence la toxicité cellulaire. Les résultats de la caractérisation des nanoparticules (indice de polydispersité) montrent que les nanoparticules de PLGA 65:35 sont moins stables que les nanoparticules de PLGA 50:50. En se basant sur ces résultats, l'hypothèse qui peut-être émise est que les Nps-Cur 65:35 seraient plus susceptibles à l'agrégation que les Nps-Cur 50:50. Probablement que les Nps-Cur 65:35 interagissent avec les ions ou espèces présentes dans le milieu de culture (ou les fluides biologiques) induisant ainsi leur agrégation et donc la formation de particules plus grosses. Ces agrégats de particules pourraient agir directement sur la mitochondrie en réduisant son activité [589]. En effet, il a été montré que différents types de nanoparticules pouvaient interagir directement sur les mitochondries et provoquer le blocage du transfert d'électrons de la chaine respiratoire mitochondriale et, par conséquent, induire la production des espèces réactives de l'oxygène [590-592]. Cette hypothèse est soutenue par l'étude de Kim et ses collaborateurs (2005) qui ont décrit que l'agrégation des nanoparticules de PLGA augmente leur taille et que cette agrégation serait causée par les interactions entre les nanoparticules et les espèces présentes dans le sang réduisant les forces répulsives électrostatiques [593]. Cependant, d'autres études seront davantage nécessaires pour mieux cerner les mécanismes d'interaction entre la surface des nanoparticules et les milieux biologiques. Certaines questions demeurent ouvertes :

- Est-ce que les effets cytotoxiques des nanoparticules de PLGA observés sur les cellules SK-N-SH sont applicables à d'autres types cellulaires?
- Quel type de mort cellulaire (apoptose ou nécrose) serait induit par l'augmentation de la concentration des nanoparticules?

#### Comment le protocole de traitement cellulaire peut-il influencer les résultats in vitro?

Dans cette thèse nous nous sommes spécifiquement focalisés sur la réalisation d'études *in vitro*, pour cela nous avons développé des protocoles d'études spécialement applicables aux nanoparticules. Dans le chapitre 1.1.5.3.2, nous avons vu que l'A $\beta$  peut contribuer à la génération d'espèces réactives de l'oxygène telle que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, c'est pourquoi nous l'avons utilisé en tant qu'inducteur de stress oxydatif.

Nous avons réalisé des études préliminaires afin de déterminer les concentrations, les temps d'incubation de  $H_2O_2$  et des différents traitements (curucmin, Nps et Nps-Cur) permettant d'obtenir un maximum d'effet. Dans un premier temps, nous avons déterminé la concentration

de  $H_2O_2$  et le temps d'incubation nécessaire permettant d'atteindre 50% de mortalité cellulaire (SK-N-SH) (500 µM pendant 24 h) et la concentration de  $H_2O_2$  induisant un maximum d'espèces réactives de l'oxygène sans provoquer de mortalité cellulaire (1mM pendant 1h). Ensuite, la réalisation d'études doses et temps réponses, nous a permis de déterminer les concentrations du curcumin et des nanoparticules. On peut cependant remarquer que pour certains résultats, la différence entre les contrôles positifs et négatifs est faible ce qui pourrait avoir pour conséquence la réduction de la fenêtre d'effet des nanoparticules par rapport au curcumin. Ainsi, dans le futur, il serait intéressant d'augmenter ces différences, pour ce faire nous pourrions :

- Augmenter le nombre de réplications ce qui permettrait de réduire les variations entre les expériences et donc d'affiner les résultats statistiques,
- Augmenter la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou la concentration de traitements, à savoir que cet ajustement est limité par la toxicité cellulaire,
- Modifier l'oxydant en traitant directement avec de l' Aβ,
- Réaliser des prétraitements avec les différents composés avant de rajouter le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui permettrait au curcumin libre ou encapsulé de protéger les cellules contre le stress oxydatif qui serait induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainsi, cela permettrait de mimer les cellules qui n'ont pas été encore touchées par le stress oxydatif dans la maladie d'Alzheimer ou afin d'étudier l'effet préventif des Nps-Cur.
- Réaliser des traitements chroniques, en effet, la maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative est donc la libération des espèces réactives de l'oxygène se ferait de manière continue au cours du développement de la maladie. Ainsi, un traitement chronique permettrait d'augmenter l'efficacité des Nps-Cur en augmentant la concentration de curcumin au cours du temps.

Dans la littérature, le  $H_2O_2$  est utilisé fréquemment en tant que modèle de stress oxydatif, cependant les protocoles de traitements cellulaires sont variables [594, 595]. Par exemple, Ray et collaborateurs (2012) ont utilisé des cellules SK-N-SH afin d'étudier l'effet protecteur des NanoCurc <sup>TM</sup> contre le stress oxydatif et la mortalité induite par le  $H_2O_2$ . Pour cela, les auteurs ont réalisé des cotraitements avec différentes concentrations de NanoCurc <sup>TM</sup> (1nM-5µM) et 100 µM de  $H_2O_2$  pendant 24 h pour obtenir un maximum de mort cellulaire et d'espèces réactives de l'oxygène [556]. Les facteurs qui pourraient expliquer la variabilité du temps et des concentrations de  $H_2O_2$  présents dans la littérature, pourrait s'expliquer par les facteurs suivants:

- le passage cellulaire
- la densité cellulaire
- la fragilité de la lignée cellulaire utilisée
- la composition du milieu de culture
- le mode de conservation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- les variations inter-expérimentateurs

Il est cependant important de noter que les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas simplement transposables aux études *in vivo* ou bien humaines.

### 3.4 Mécanismes d'internalisation cellulaire des nanoparticules de PLGA

L'internalisation et la localisation subcellulaire des nanoparticules de PLGA encapsulant le curcumin sont des paramètres cruciaux à déterminer afin de comprendre leur activité neuroprotectrice.

### Étude de l'internalisation des nanoparticules de PLGA par les cellules SK-N-SH

Dans un premier temps, la mise au point de la technique de détection de l'internalisation des nanoparticules de PLGA par les cellules SK-N-SH a été réalisée à l'aide des Nps-Cur 65:35 via l'observation de l'auto-fluorescence du curcumin. Les résultats obtenus ont été ensuite confirmés par la microscopie confocale à l'aide de Nps-Cur 50:50. Les cellules SK-N-SH ont été traitées pendant une heure à 37°C. Notre étude démontre que les Nps-Cur 65:35 et Nps-Cur 50:50 augmentent l'internalisation du curcumin par les cellules SK-N-SH. Plus précisément, les Nps-Cur 50:50 augmentent l'internalisation du curcumin de 4,4 fois par les cellules SK-N-SH comparée au curcumin libre. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Anand et collaborateurs qui ont montré que l'encapsulation du curcumin par des nanoparticules de PLGA augmente l'internalisation cellulaire du curcumin par les cellules humaines issues d'une leucémie myéloïde chronique (KBM-5) comparé au curcumin libre [560]. Des études ont suggéré que les nanoparticules de PLGA étaient internalisées par endocytose ou par pinocytose, de manière

temps et dose-dépendants et que cette internalisation peut être saturable [459, 496]. Les études temps-réponses indiquent qu'une fois les nanoparticules de PLGA internalisées, elles seront transportées vers les endosomes puis vers les lysosomes d'où elles vont rapidement sortir (après moins de dix minutes d'incubation) et être libérées dans le cytoplasme [459]. Les lysosomes contiennent des hydrolases activent à pH 5 qui vont dégrader aussi bien du matériel exogène qu'endogène [596]. La fuite des nanoparticules, des lysosomes vers le cytoplasme peut s'expliquer par leur charge surfacique. En effet, il a été démontré que les nanoparticules non chargées à pH acide telles que les nanoparticules de polystyrène restent dans le compartiment lysosomial [597]. L'hypothèse que l'on peut émettre dans notre cas, provenant du fait que les nanoparticules synthétisées sont chargées, elles ne seront pas séquestrées dans les lysosomes et pourront être libérées dans le cytoplasme. Ainsi, l'efficacité thérapeutique des nanoparticules du PLGA serait due à leur capacité de protéger les composés encapsulés de la dégradation par les enzymes lysosomales, ce qui est en accord avec nos résultats, montrant qu'une heure après traitement les Nps-Cur 65:35 et 50:50 sont très largement présents dans le cytoplasme et le noyau. La présence du curcumin encapsulé au niveau du noyau est particulièrement intéressante, car cela suggère que le curcumin pourra induire l'expression de nombreux gènes codant pour des facteurs de transcription (Nrf2, Nf- $\kappa$ B) ou des protéines (HO-1, SOD etc.) ayant une activité antioxydante [598-601].

Nous avons réalisé une étude préliminaire (Figure 19), afin de déterminer plus précisément les mécanismes de transport (actif ou passif) impliqués dans l'internalisation des nanoparticules de PLGA encapsulant le curcumin, par les cellules SK-N-SH. Ces dernières ont été traitées avec les Nps-Cur 65:35 et ont été directement placées soit à 4 °C (pour bloquer le transport actif) soit à 37 °C pendant la durée du traitement (1 heure). L'auto-fluorescence du curcumin a été finalement observée par microscopie à fluorescence. Les résultats obtenus montrent que le curcumin est internalisé au niveau du cytoplasme, du noyau et des prolongements dendritiques aussi bien à 4°C qu'à 37°C. Cela suggère donc que les nanoparticules de PLGA peuvent être internalisées par **simple diffusion**. Cependant, avant d'arriver à cette conclusion, il faudrait compléter cette étude, car comme décrit plus haut ce résultat est préliminaire et d'autre part il faudrait comparer la quantité de fluorescence émise par les cellules traitées à 4°C et à 37°C.

Ainsi, à partir de la littérature et de nos résultats préliminaires, nous avons pu émettre ces hypothèses:

- La possibilité que les nanoparticules de PLGA s'internalisent par transport passif serait très faible contrairement au curcumin libre qui diffuserait à travers la membrane plasmique par ce moyen.
- Les nanoparticules de PLGA de petites tailles pourraient pénétrer par transport passif et les plus grosses par transport actif.
- La fluorescence observée pourrait correspondre à l'internalisation du curcumin qui se trouve libéré par les nanoparticules dans le milieu de culture.





Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu) et l'internalisation des Nps-Cur 65:35 (fluorescence verte) a été détectée par microscopie à fluorescence.

#### Importance de la localisation des nanoparticules dans la cellule

Tel que décrit précédemment, le curcumin est largement présent dans le cytoplasme et dans le noyau, permettant ainsi d'agir spécifiquement sur certains organites tels que la mitochondrie [602, 603]. Récemment, il a été montré par imagerie sur des cellules vivantes que les nanoparticules étaient internalisées très rapidement (moins d'une heure) au niveau du cytoplasme et du noyau et que le transport des nanoparticules vers le noyau se faisait par simple

diffusion et transport actif. De plus, il fut démontré que les nanoparticules se fixent préférentiellement sur la mitochondrie [604-606]. Cependant, les mécanismes d'internalisation des nanoparticules et leur trafic intracellulaire sont largement méconnus et nécessitent davantage d'études avant d'être utilisés comme systèmes de transport de médicaments.

# 3.5 Quel est l'impact biologique de l'encapsulation du curcumin dans les nanoparticules PLGA ?

La maladie d'Alzheimer est une maladie multifactorielle qui met en jeu de nombreux mécanismes [172]. Son traitement nécessite donc un composé tel que le curcumin qui détient de nombreuses activités : antioxydante, anti-inflammatoire, antiproliférative, anti-amyloïde $\beta$  et anti-tau [389]. De plus, les mécanismes d'action du curcumin sont complexes, agissant par exemple sur de nombreuses voies de signalisations impliquées dans la maladie d'Alzheimer et activées par le stress oxydatif telles que la voie antioxydante Nrf2, la voie de l'inflammation NF- $\kappa$ B et la voie de la survie cellulaire Akt [607-609]. Un de nos objectifs majeur était d'augmenter l'efficacité neuroprotectrice du curcumin via son encapsulation.

# Effet neuroprotecteur du curcumin encapsulé dans les nanoparticules de PLGA contre la mort cellulaire induite par un stress oxydatif

De nombreuses études ont été effectuées sur l'effet des nanoparticules de PLGA encapsulant le curcumin mais leur effet sur les cellules nerveuses reste à déterminer. À l'aide des tests de survie cellulaire et de mortalité cellulaire, nous avons tout d'abord démontré que les nanoparticules préparées sont non toxiques. Ensuite, nous avons montré que les Nps-Cur 65:35 protègent les cellules SK-N-SH de la mortalité cellulaire induite par le  $H_2O_2$ . Nous avons confirmé ces résultats en démontrant que les Nps-Cur 50:50 protègent également les cellules SK-N-SH de la mortalité induite par l'acroléine [230] alors que le curcumin vide avec les mêmes concentrations ne présente aucune activité neuroprotectrice. Ces résultats sont particulièrement intéressants, car l'acroléine est un composé hautement réactif et plus toxique que le  $H_2O_2$  [610]. Ainsi, l'effet neuroprotecteur du curcumin encapsulé par les nanoparticules de PLGA serait probablement dû à une plus grande internalisation du curcumin que le curcumin libre. Cho et collaborateurs (2010) ont également démontré que l'encapsulation de l'hydralazine (un composé permettant de réduire la pression artérielle) dans des nanoparticules de chitosan protège les cellules PC12 de la mortalité induite par l'acroléine. Dans cette étude, les auteurs ont particulièrement souligné que l'effet protecteur des nanoparticules serait lié, d'une part, au piégeage de l'acroléine par l'hydralazine et, d'autre part, de la capacité du chitosan à maintenir l'intégrité membranaire [611].

#### Étude des propriétés antioxydantes du curcumin encapsulé dans les nanoparticules de PLGA

Nous avons également montré que l'encapsulation du curcumin dans les nanoparticules de PLGA conserve ses propriétés antioxydantes en piégeant le radical libre DPPH. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Mathew et collaborateurs (2012) qui en plus d'avoir montré que l'encapsulation de curcumin n'affecte pas sa capacité à piéger les radicaux libres, ont également montré que l'encapsulation du curcumin dans les nanoparticules de PLGA permet de détruire les agrégats d'A $\beta$  [612]. Le test de l'ORAC confirme que l'encapsulation du curcumin n'altère pas sa capacité antioxydante et permet d'augmenter son efficacité de piégeage des radicaux libres en comparaison avec le curcumin libre. Des résultats similaires ont été décrits pour le curcumin encapsulé dans des nanofibres de Poly( $\varepsilon$ -Caprolactone) [613]. Cependant, l'activité antioxydante du curcumin encapsulé dans les nanoparticules de PLGA sur les cellules neuronales a été très peu étudiée, uniquement deux études ont été réalisées :

- L'étude de Ray et collaborateurs (2011) qui ont également montré l'effet protecteur du curcumin encapsulé dans les nanoparticules (NanoCurc) sur les cellules SK-N-SH et cela pour différentes doses de NanoCurc (1nm à 5μM) vis-à-vis du stress oxydatif induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [556].
- L'étude de Cho et ses collaborateurs (2010) ont montré que les nanoparticules de chitosan réduisent le niveau des espèces réactives de l'oxygène induit par l'acroléine chez les cellules PC12, via son action de reconstruction membranaire et non pas par l'action directe de piégeage des radicaux libres [611, 614].

Il a également été montré que d'autres types de nanoparticules peuvent agir sur le stress oxydatif tel que les nanoparticules composées de carbones qui présentent une activité antioxydante en piégeant les radicaux libres [615].

Nos résultats démontrent que  $0.07\mu$ M de Nps-Cur 65:35 réduisent les espèces réactives à l'oxygène aussi efficacement que le curcumin à 5 $\mu$ M. Par contre, les Nps-Cur 50:50 à 0,5  $\mu$ M sont aussi efficaces que le curcumin libre à la même concentration. De plus, différentes concentrations de Nps-Cur 50:50 (0.07  $\mu$ M, 0.25 $\mu$ M et 0.1 $\mu$ M) ont été testées sur le niveau des espèces réactives de l'oxygène induites par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les effets observés ne sont pas dosedépendants. Il se pourrait que le piégeage des radicaux libres par le curcumin encapsulé soit « saturé », c'est à dire, que la concentration la plus faible de curcumin encapsulé peut-être aussi efficace que des concentrations croissantes de curcumin libre. De plus, nous avons montré que l'encapsulation du curcumin dans les nanoparticules de PLGA est stable durant une période d'au moins six mois, contrairement au curcumin libre qui se dégrade au bout de 30 minutes [436]. Ainsi, même si l'efficacité du curcumin encapsulé et libre est la même, le curcumin encapsulé aura un effet à plus long terme.

Effets du curcumin encapsulé dans les nanoparticules de PLGA sur les voies de signalisations impliquées dans la maladie d'Alzheimer

Depuis les dix dernières années, le nombre d'études réalisées sur les nanoparticules polymériques et biodégradables encapsulant le curcumin ne cesse d'augmenter. Toutefois, cellesci ciblent majoritairement le transport de médicaments spécifiques au cancer, alors que les études visant le transport de médicaments vers le cerveau et les neurones pour le traitement des maladies neurodégénératives sont peu étudiées. Ainsi, nos recherches sont particulièrement novatrices, car nous avons mis en évidence l'action du curcumin encapsulé dans les nanoparticules de PLGA sur trois différentes voies de signalisation cellulaire impliquées dans la maladie d'Alzheimer. La voie Keap1/Nrf2: Nous avons montré que le curcumin encapsulé dans les nanoparticules conserve son activité antioxydante dans les cellules SK-N-SH. Ce résultat est renforcé par l'action préventive des Nps-Cur 65:35 (comparable à celle du curcumin libre), contre la diminution du GSH induit par le  $H_2O_2$ . Ainsi, on se basant sur les effets de piégeage des radicaux libres et du maintien du niveau de GSH des nanoparticules de curcumin, nous avons étudié l'effet des Nps-Cur 65:35 et 50:50 sur l'activité du facteur de transcription Nrf2 qui joue un rôle important dans le maintien du potentiel redox de la cellule en se liant aux éléments de réponses antioxydantes (ARE) et aux enzymes de phases 2. Les deux types de nanoparticules protègent aussi efficacement que le curcumin libre contre l'activation de facteur de transcription Nrf2 induit la synthèse de nombreuses protéines par les neurones et les astrocytes impliquées dans la protection contre le stress oxydatif, l'inflammation et la mort cellulaire [225].

<u>La voie NF- $\kappa$ B</u> : Il existe suffisamment de preuves qui indiquent que NF- $\kappa$ B contribue au développement de maladies neurodégénératives en contrôlant l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires [616]. Or, de nombreuses études ont montré que l'effet anti-inflammatoire du curcumin passe par la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Nos résultats démontrent que les Nps-Cur 50:50 réduisent l'expression du facteur de transcription NF- $\kappa$ B aussi efficacement que le curcumin libre et qu'elles diminuent l'expression de la protéine MM-9 impliquée dans l'invasion cellulaire [617]. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études réalisées sur des cellules cancéreuses [544, 560, 563].

La voie Akt/GSK3- $\beta$ / pTau : Il a été rapporté que la voie de signalisation Akt/GSK3- $\beta$  est activée par le stress oxydatif chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et que la protéine GSK3- $\beta$  est impliquée dans la phosphorylation de la protéine Tau [222, 618, 619]. GSK3- $\beta$  est constitutivement active dans la cellule et négativement régulée par sa phosphorylation au niveau de la serine 9 par Akt. De plus, nous avons récemment montré que le curcumin est capable de bloquer la diminution de la pAkt induite par l'acroléine [230]. En se basant sur ces informations, nous avons émis l'hypothèse que la modulation de cette voie de signalisation par le curcumin libre et encapsulé dans les nanoparticules de PLGA serait

impliquée dans les mécanismes de neuroprotection contre le stress oxydatif. Nous avons observé que le curcumin et les nanoparticules de curcumin protègent de la phosphorylation d'Akt induite par le  $H_2O_2$ . Cependant, aucun effet protecteur du curcumin libre ou du curcumin encapsulé ne fut observé auprès de GSK3- $\beta$ . Pour expliquer ce phénomène, deux hypothèses peuvent être émises :

 L'effet neuroprotecteur du curcumin ne passerait pas par la voie de signalisation Akt/GSK-3, mais serait médié à travers les voies de signalisation Nrf2 et NF-κB.

(2) Les conditions du traitement (concentration et durée) des cellules SK-N-SH ne seraient peut être pas adéquates et nécessiteraient des ajustements à l'observation d'effets neuroptotecteurs. De nombreuses études soutiennent cette hypothèse. En effet, une étude réalisée sur des cellules de neuroblastomes humains, les SH-SY-5Y, montre que l'inhibition de l'activité de GSK3-β par le curcumin varie en fonction de la dose et de la durée de traitements [567]. De plus, il a été récemment montré que l'administration en intra-péritonéale de curcumin encapsulé dans des nanocapsules à cœur lipidiques et de curcumin libre serait capable de restaurer la phosphorylation d'Akt et d'inhiber l'activité de GSK-3 sur des animaux ayant reçu de l'Aβ (1-42) par injection intracérébroventriculaire [620]. En opposition, avec les résultats obtenus pour GSK3 nous avons montré que le curcumin libre et les Nps-Cur 50:50 protègent de la phosphorylation de la protéine Tau induite par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Or, la phosphorylation de la protéine Tau n'est pas uniquement régulée par la GSK3, mais par la balance entre différentes kinases (CDK5 et MAPK) et phosphatases (PP1, PP2A et 2B). De plus, certaines de ces kinases et phosphatases sont connues pour être régulées par le curcumin [617, 621, 622]. En nous basant sur ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que le curcumin et les Nps-Cur 50:50 protègent de la phosphorylation de la protéine Tau en passant soit par l'inhibition d'autres kinases, soit par l'activation de phosphatases.

Nous avons démontré que le curcumin encapsulé dans les nanoparticules de PLGA protège efficacement les cellules neuronales contre le stress oxydatif. Ainsi, pour que ces nanoparticules soient efficaces dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, elles doivent transporter le curcumin au niveau du cerveau et maintenir leur activité neuroprotectrice au cours du temps. Or, il a été montré que les nanoparticules de PLGA permettent de transporter le

curcumin vers le cerveau et qu'il s'accumule principalement au niveau de l'hippocampe une heure après leur administration en i.v. [552].

Afin d'avoir une étude plus complète sur les mécanismes biologiques contrôlés par le curcumin encapsulé dans les nanoparticules de PLGA, il aurait été intéressant de déterminer son effet sur la mitochondrie, sur les voies de signalisation impliquées dans l'apoptose, sur l'  $A\beta$ , et sur la plasticité synaptique, etc.

## 3.6 Évaluation de l'effet neuroprotecteur des nanoparticules vide de PLGA

Effet neuroprotecteur	Nps 65:35	Nps 50:50
Survie cellulaire	+	+
Stress oxydatif	+	+
DPPH	ND	-
ORAC	ND	+
GSH	-	ND
Keap1	ND	-
Nrf2 (fraction nucléaire)	-	+
P50 (fraction nucléaire)	ND	-
pAkt	ND	+
MMP-9	ND	-
pGSK3	ND	-

Tableau 3-2 Comparaison de l'effet neuroprotecteur des Nps 65:35 et Nps 50:50

## (+ = effet observé, - = pas d'effet et ND = non- déterminé)

La caractérisation des nanoparticules de PLGA vides a permis de conclure qu'elles sont moins stables (potentiel zêta  $6,4 \pm 0,3$ ) et moins monodispersées (PDI =  $0,30 \pm 0,013$ ) que les nanoparticules encapsulant le curcumin. Cependant, les méthodes de caractérisation utilisées ne sont pas adaptées à l'étude des nanoparticules vides. En effet, l'une de leurs principales limitations est la détermination de leur concentration qui reste difficile à quantifier contrairement aux Nps-Cur, leur concentration ne peut pas être déterminée par HPLC couplé à un détecteur UV, de plus les nanoparticules n'ont pas été lyophilisées et donc leur masse n'a également pas pu être déterminée. Les nanoparticules vides devraient être utilisées afin de distinguer l'effet du composé encapsulé de celui des excipients employés dans la synthèse des nanoparticules. Nos résultats révèlent que les nanoparticules vides réduisent le niveau des espèces réactives de l'oxygène et module l'expression de certaines protéines impliquées dans les mécanismes de stress oxydatif suggérant ainsi que le PLGA interagirait avec les radicaux libres (tableau 3-2). Il est cependant difficile de conclure à leurs potentiels effets, car jusqu'à présent, les interactions entre les nanoparticules vides de PLGA et les radicaux libres restent peu étudiées. Il est intéressant de noter que dans la littérature cette condition est souvent manquante. Cependant, il a été montré que leurs effets sur la diminution des espèces réactives à l'oxygène pourrait être liée à la recombinaison du radical libre pyroxyle et de la chaine polymérique de PLGA [623] ou encore la formation de pont disulfure entre le microenvironnement cellulaire et les nanoparticules sensibles au potentiel redox [24]. Plus d'études sont donc nécessaires afin de comprendre la relation entre la surface des nanoparticules et les espèces réactives de l'oxygène.

# 3.7 Quels sont les bénéfices liés à l'utilisation de nanoparticules dans le traitement de la maladie d'Alzheimer ?

L'augmentation du nombre de maladies neurodégénératives a eu pour conséquence, au cours des dix dernières années, le développement de nombreuses stratégies thérapeutiques ciblant le cerveau [529]. Cependant, l'utilisation des méthodes classiques de développement de traitements pharmacologiques se heurte à des difficultés pharmacocinétiques et

pharmacodynamiques réduisant leur efficacité et leur sélectivité. De plus, de nombreux composés, comme le curcumin, sont peu solubles en milieu aqueux, faiblement biodisponibles et rapidement éliminés de l'organisme. Par ailleurs, cibler spécifiquement un composé thérapeutique vers le cerveau est particulièrement difficile du fait des limitations établies par les mécanismes d'opsonisation du système circulatoire, par la barrière-hémato-encéphalique et par les effets secondaires périphériques [624]. Ainsi, l'utilisation de nanoparticules plus spécifiques permettrait de surmonter ces limites s'avère être une solution prometteuse. De nombreuses études ont déjà démontré des résultats encourageants dans le contrôle et le transport spécifique de médicaments ciblant la maladie d'Alzheimer. Nous avons d'ailleurs largement développé cette question dans notre revue [529] (Annexe 3).

Ainsi, les nanoparticules ont pour avantage d'augmenter l'efficacité, la solubilité, la stabilité et l'absorption du curcumin lors de leur administration par voie orale tandis qu'elles permettent d'éviter sa dégradation prématurée dans le sang lors de leur administration par voie intraveineuse. Tous ces avantages résultent en l'augmentation du temps de circulation du composé bioactif dans le sang et maximisent, par conséquent, son action thérapeutique. L'intérêt principal de l'utilisation des nanoparticules est de permettre d'augmenter leur passage à travers la barrière hémato-encéphalique et ainsi d'agir sur une région spécifique, tel que l'hippocampe, réduisant ainsi les effets secondaires périphériques. Cependant, il est important de préciser que cet avantage n'est pas spécifique à toutes les nanoparticules, mais essentiellement à ceux de la deuxième et de la troisième génération [532]. Pour finir, les nanoparticules en augmentant l'efficacité du curcumin résulte en la réduction de la dose et de la fréquence d'administration du composé, ce qui induit, par conséquent, l'amélioration de la qualité de vie du patient.

# 3.8 Quelle est la meilleure stratégie d'administration des nanoparticules de curcumin ?

Dans la majorité des études *in vivo*, les nanoparticules testées ont été administrées par des techniques d'injection (méthodes invasives) et sont captées par les mécanismes d'opsonisation [624]. Cependant, d'autres voies d'administration non-invasives peuvent être considérées telles que l'administration par voie nasale ou l'administration par voie orale. L'administration par voie

nasale permet d'éviter le transport à travers la barrière hémato-encéphalique. Cependant, de nombreuses lacunes résident dans la compréhension des mécanismes de relargage du composé encapsulé dans les nanoparticules au niveau de la cavité olfactive et des mécanismes de transport à travers le système olfactif [625]. Ainsi, le mode d'administration le plus adéquat serait l'administration orale.

# 3.9 Les limitations de l'utilisation des nanoparticules pour un traitement contre la maladie d'Alzheimer

Nonobstant, les applications prometteuses des nanoparticules dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, il est important de considérer aussi bien l'aspect toxique que non toxique des nanoparticules. Des études récentes ont notamment démontré que certains types de nanoparticules peuvent être neurotoxiques [626]. Cet aspect doit être particulièrement examiné du fait de leur haute réactivité liée au rapport surface/unité de masse. Tel que décrit plus haut, l'impact biologique des nanoparticules dépend de leurs taille, composition, morphologie, solubilité et agrégation. En effet, les nanoparticules peuvent interagir de manière non-spécifique avec différentes molécules ou protéines présentes dans la cellule modifiant ainsi leurs propriétés et causant, par conséquent, une toxicité cellulaire. Jusqu'à présent, très peu d'études ont montré l'impact des nanoparticules dans le cerveau et particulièrement, leurs effets sur les dysfonctions neuronales. Malgré le nombre croissant d'études *in vitro* et les modèles animaux, il est important d'étudier le comportement des nanoparticules dans un organisme. Les nanoparticules ont une forte probabilité d'agrégation formant par conséquent des amas qui pourront obstruer le débit sanguin. De plus, ces agrégats peuvent se loger au niveau de différents organes ayant pour conséquences l'apparition possible d'embolie pulmonaire, d'accident vasculaire cérébral, d'infarctus et d'autres microlésions qui peuvent se trouver à distances de l'organe cible [627]. La compréhension des mécanismes d'internalisation cellulaire et de distribution des nanoparticules vers différents organes ou tissus demeure peu étudiée. Il est donc important de prendre en considération qu'un mauvais guidage de nanoparticules pourrait induire des effets secondaires périphériques. Afin de mieux comprendre la trajectoire des nanoparticules de la zone

d'administration au cerveau, il serait intéressant d'encapsuler un composé fluorescent et de réaliser de l'imagerie à fluorescence *in vivo* chez un modèle animal [628, 629].

Bien que de nombreuses études suggèrent que certaines nanoparticules sont capables de traverser la barrière-hémato-encéphalique, les mécanismes de transport sont encore loin d'être connus et doivent être clarifiés. En effet, certains types de nanoparticules peuvent induire du stress oxydatif et la formation de radicaux libres perturbant le fonctionnement des cellules endothéliales et causant le dysfonctionnement de la barrière-hémato-encéphalique. De plus, la rupture de la barrière-hémato-encéphalique par les nanoparticules peut également induire la pénétration de virus ou d'autres agents pathogènes [630].

Par ailleurs, de nombreuses formulations ont été développées à base de PLGA pour un usage clinique pharmaco-thérapeutique dans le traitement du cancer tel que Lupron Depot®, utilisé dans le traitement du stade avancé du cancer de la prostate [631-633]. Cependant, les recherches concernant les maladies neurodégénératives sont encore au stade de l'évaluation *in vivo* des mécanismes pharmacocinétiques, de la biodistribution et de la toxicité. Avant l'utilisation clinique des nanoparticules chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de nombreuses études sont nécessaires afin de démontrer que leur efficacité est supérieure à leur possible toxicité [631].

L'émergence de la plupart des nouvelles technologies fait place à plusieurs débats. Dans ce cas, les sujets s'orientent vers les possibles effets secondaires provenant de l'utilisation des nanoparticules. En effet, la plupart des nanoparticules n'ont pas été suffisamment caractérisées afin de montrer leurs bénéfices biologiques. Ainsi, il est important d'évaluer les risques/bénéfices de leur utilisation. De nombreuses questions restent encore sans réponses, par exemple : Quelle sera la concentration du composé libéré des nanoparticules une fois arrivé au cerveau ? Quel est le temps de rétention des nanoparticules dans l'organisme ? Est-ce que les produits de la dégradation des nanoparticules sont toxiques ? Est-ce que tous les organismes

vivants vont réagir de la même façon ? Quel serait l'effet sur l'environnement de l'élimination des nanoparticules par les fluides humains ?

### **4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Jusqu'à présent, les nouvelles stratégies développées dans le traitement de la maladie d'Alzheimer ont abouti à de nombreux échecs. En effet, parmi un grand nombre de composés testés ayant des cibles et des mécanismes d'action différents, seuls quelques-uns ont montré une efficacité clinique. Les traitements des maladies neurodégénératives sont soumis à de nombreuses restrictions biologiques telles que la barrière-hémato-encéphalique, les mécanismes d'opsonisation par les protéines plasmatiques et les effets secondaires périphériques. Afin de contrecarrer ces limitations, au cours des dix dernières années, un intérêt particulier a été porté sur l'utilisation de nanoparticules à des fins thérapeutiques ciblant la maladie d'Alzheimer principalement aux nanoparticules polymériques et biodégradables composées de PLGA. Les résultats de ces études ont permis la mise au point des techniques de synthèse adaptées à la structure chimique du composé encapsulé et une meilleure compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans leur internalisation cellulaire.

En comparaison avec d'autres études réalisées sur les nanoparticules biodégradables et biocompatibles composées de PLGA, nos résultats sont particulièrement novateurs, car nous avons étudié en profondeur deux volets distincts, mais complémentaires : la caractérisation physico-chimique du curcumin encapsulé dans les nanoparticules composées de PLGA et leurs effets sur les mécanismes biologiques impliqués dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. La caractérisation des nanoparticules du curcumin nous a permis de mettre en évidence l'importance de la composition de la matrice polymérique. En effet, nous avons montré que le changement de ratio acide lactique/acide glycolique permettait de modifier le pourcentage d'encapsulation du curcumin et sa cinétique de relargage. Dans le cas présent, l'utilisation des nanoparticules de PLGA 50:50 à la place des nanoparticules de PLGA 65:35 nous a permis d'augmenter le pourcentage d'encapsulation du curcumin et de ralentir la vitesse de libération du curcumin par les nanoparticules dans le but ultime de prolonger l'efficacité du curcumin à long terme chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Bien que le nombre d'études *in vitro*  et *in vivo* a fortement augmenté au cours des dernières années, pour la première fois, nous avons mis en évidence que l'encapsulation du curcumin par des nanoparticules de PLGA permettait d'augmenter l'internalisation du curcumin par les cellules les SK-N-SH, préférentiellement au niveau du cytoplasme et du noyau. De plus, nous avons montré que l'encapsulation du curcumin par les nanoparticules de PLGA protège aussi efficacement ou dans certaines conditions plus efficacement que le curcumin libre contre le stress oxydatif induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> probablement en protégeant le curcumin de sa dégradation dans le milieu de culture. Ce qui est particulièrement novateur dans ce projet est l'étude de l'effet de l'encapsulation du curcumin par les nanoparticules de PLGA sur les voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de protection contre le stress oxydatif. En effet, nous avons montré que l'encapsulation du curcumin dans les nanoparticules de PLGA régule différentes voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de protection contre le stress oxydatif. En effet, nous avons montré que l'encapsulation du curcumin dans les nanoparticules de PLGA régule différentes voies de signalisation impliquées dans la maladie d'Alzheimer : la voie Nrf2 (antioxydante), la voie NF- $\kappa$ B (pro-inflammatoire) la voie Akt/ GSK3 (survie cellulaire) et la phosphorylation de la protéine Tau.

À ce jour, de nombreux modèles murins ont été développés afin d'étudier des nouvelles molécules dans le traitement de la maladie d'Alzheimer tels que des souris mutées sur les gènes de la présiline (1 et 2), du précurseur de l'Aβ ou encore sur la protéine Tau. Cependant, soit ces mutations ne provoquent pas l'apparition des plaques soit elles induisent uniquement l'apparition des dépôt d'Aβ ou l'hyperphosphorylation de la protéine Tau [119]. Récemment, un modèle de souris triple transgénique (3xTg) a été développé possédant des mutations pathologiques au niveau de APP, de PS1 et de Tau, ce modèle semblerait reproduire plus fidèlement les deux lésions spécifiques à la maladie d'Alzheimer [216]. Ainsi, dans le futur, il serait judicieux d'étudier in vivo l'effet neuroprotecteur du curcumin encapsulé dans des nanoparticules de PLGA 50:50 sur un modèle animal de la maladie d'Alzheimer tel que les 3xTg. Cette étude permettrait de déterminer la biodistribution et la biodisponibilité des nanoparticules et d'évaluer l'augmentation de l'efficacité du curcumin par son encapsulation, afin de déterminer si le traitement aurait une action préventive et/ou curative le curcumin encapsulé pourrait être administré soit avant ou après l'apparition des plaques d'Aß. Considérant, les résultats encourageant des nanoparticules, il serait pertinent d'encapsuler d'autres composés thérapeutiques tels que différents polyphénols, des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ou des

composés pharmaco-thérapeutiques impliqués dans différentes pathologies neurodégénératives afin d'augmenter leur biodisponibilité systémique permettant ainsi l'augmentation de leur efficacité thérapeutique.

#### Quel sera le type de nanoparticule idéal du futur ?

Le type de nanoparticule idéal serait celui qui transporterait le principe actif vers la cellule cible tel que les neurones de l'hippocampe. Pour cela, elle devrait être constituée d'une matrice polymérique renfermant la molécule bioactive et de la présence d'un ligand à la surface de la particule qui pilote les nanoparticules vers un type cellulaire ou un organe cible (nanoparticules de deuxième et de troisième génération). Ce système de reconnaissance spécifique (ou de ciblage actif) favoriserait l'internalisation des particules par les cellules neuronales permettant d'accroitre la concentration disponible de la molécule dans la cellule cible, améliorant ainsi l'effet thérapeutique. Dans le cas du système nerveux central, de nombreux ligands ont déjà été utilisés et ont montré un réel potentiel tels que le peptide tet-1, l'ApoE et la transferrine [612, 634-636].

Malgré les applications prometteuses des nanoparticules, leurs possibles toxicités cérébrales et effets secondaires doivent être considérés. En effet, davantage d'études sont nécessaires en termes de rétention dans l'organisme, de temps d'exposition, de taille, de dose et de métabolites formés avant leur utilisation clinique dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Cependant, le développement rapide des nanotechnologies contribue à combler certaines lacunes dans notre connaissance des possibles effets toxiques des nanoparticules, particulièrement pour les applications à long-terme. Du fait de la nature interdisciplinaire de la nano-neuropharmacologie, il est important que les experts de différents domaines incluant la biologie, la chimie, la pharmacologie, la nanotechnologie, la physiologie, la science de la matière et l'ingénierie travaillent ensemble dans le but de développer une stratégie prometteuse dans le transport de médicaments.

## 5 AUTRES CONTRIBUTIONS

# 5.1 Annexe 1 : Le curcumin protége les cellules neuronales contre le $H_2O_2$ en restaurant les voies de signalisation Akt et sensibles au potentiels redox.

#### 5.1.1 Contribution de l'étudiante

Cet article a été publié dans le journal *Molecular Nutrition & Food Research* (impact facteur 4.31). Sur cet article je suis en co-auteure avec Abdenour Belkacemi (étudiant au doctorat). J'ai défini les expériences de cet article. J'ai réalisé la majorité des expériences de survie, de mortalité cellulaire et de stress oxydatif, certains répliquats ont été réalisés par Morgane Perrotte (étudiante stagiaire) sous ma supervision. J'ai réalisé les immunobuvardages de type western des facteurs de transcription (Nrf2 et P50) et des protéines (keap1, pAkt, Sirt 1 et pGSK3). L'immunobuvardage de type western de la protéine  $\gamma$ -GCS et la quantification du niveau de GSH et des protéines carbonylés ont été réalisés par Abdenour Belkacemi. Finalement, les effets par Ghislain Djiokeng Paka (étudiant au doctorat). Le travail d'écriture a été divisé en fonction des expériences réalisées par chacun. La cohésion du travail a été réalisée par notre directeur de recherche. Les réponses aux correcteurs ont été rédigées par les trois premiers auteurs. La soumission de l'article a été réalisée par mon directeur de thèse le Pr. Charles Ramassamy.

# 5.1.2 Article: Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

# 5.2 Annexe 2 : Les défis associés au curcumin dans la thérapie de la maladie d'Alzheimer

### 5.2.1 Contribution de l'étudiante

Cette revue a été publiée dans le journal *expert reviews in molecular medecine* (impact facteur 7.14). Dans cette revue, je suis en deuxième auteure. J'ai écrit 50% du texte et Abdenour Belkacemi a écrit les 50% restants. Le Pr. Charles Ramassamy a supervisé l'écriture et effectué les modifications finales ainsi que la soumission de la revue.

### 5.2.2 Revue 1: Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

# 5.3 Annexe 3 : Application thérapeutique des nanoparticules dans la maladie d'Alzheimer

### 5.3.1 Contribution de l'étudiante

Cette revue a été publiée dans *Journal of Controlled Release* (impact facteur 7.533). Dans cette revue, je suis en deuxième auteure, j'ai participé à 40% de la rédaction et la première auteure, Jasjeet Kaur Sahni a rédigé 60%. La supervision de l'écriture et la cohésion des différentes parties ont été réalisées par mon direct de recherche. La soumission de l'article a été effectuée par mon directeur de thèse le Pr. Charles Ramassamy.

### 5.3.2 Revue 2 : Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.
### 5.4 Annexe 4 : Article original

5.4.1 Neuronal uptake and neuroprotective effect of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the human SK-N-SH cell line

.

# Neuronal Uptake and Neuroprotective Effect of Curcumin-Loaded PLGA Nanoparticles on the Human SK-N-SH Cell Line

Sihem Doggui<sup>a,b,1</sup>, Jasjeet Kaur Sahni<sup>a,b,d,1</sup>, Madeleine Arseneault<sup>a</sup>, Lé Dao<sup>h</sup> and Charles Ramassamy<sup>a,c,\*</sup> <sup>a</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada <sup>b</sup>INRS-EMT, QC, Canada <sup>c</sup>Faculté de Médecine, Université Laval, QC, Canada <sup>d</sup>Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Jamia Hamdard, New Delhi, India

Accepted 20 February 2012

Abstract. Curcumin, a natural polyphenolic pigment present in the spice turmeric (*Curcuma longa*), is known to possess a pleiotropic activity such as antioxidant, anti-inflammatory, and anti-amyloid- $\beta$  activities. However, these benefits of curcumin are limited by its poor aqueous solubility and oral bioavailability. In the present study, a polymer-based nanoparticle approach has been utilized to deliver drugs to neuronal cells. Curcumin was encapsulated in biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) based-nanoparticulate formulation (Nps-Cur). Dynamic laser light scattering and transmission electronic microscopy analysis indicated a particle diameter ranging from 80 to 120 nm. The entrapment efficiency was 31% with 15% drug-loading. *In vitro* release kinetics of curcumin from Nps-Cur revealed a biphasic pattern with an initial exponential phase followed by a slow release phase. Cellular internalization of Nps-Cur was confirmed by fluorescence and confocal microscopy with a wide distribution of the fluorescence in the cytoplasm and within the nucleus. The prepared nanoparticles (Nps) and curcumin-loaded PLGA nanoparticles (Nps-Cur) were nontoxic to human neuroblastoma SK-N-SH cells. Moreover, Nps-Cur was able to protect SK-N-SH cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and prevent the elevation of reactive oxygen species and the consumption of glutathione induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Taken together, these results suggest that Nps-Cur could be a promising drug delivery strategy to protect neurons against oxidative damage as observed in Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, antioxidant, glutathione, Nrf2, reactive oxygen species

#### INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) represents the most common form of dementia and neurodegenerative disorders, and the most prevalent ailments of the current century. AD affects more than 24.3 million people worldwide and becomes one of the most severe progressive socio-economical and medical burden facing countries all over the world [1]. During the past two decades, considerable effort was aimed to a better understanding of the cause of this neurodegenerative disorder with the ultimate hope of developing safe and effective pharmacological treatments. Among them, choline esterase inhibitors were introduced with great expectations but only 25–50% of patients respond to this pharmacotherapy [2]. Furthermore, peripheral

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Correspondence to: Charles Ramassamy, INRS-Institut Armand-Frappier, 531, boul. des Prairies, H7V 1B7 Laval, QC, Canada. Tel.: +1 450 687 5010; E-mail: charles.ramassamy@ iaf.inrs.ca.

adverse effects were the most common causes for the discontinuation of this pharmacotherapy. Finally, irrespective of the form of therapy, the current therapies do not target the underlying pathogenesis of AD and thus provide only temporary symptomatic relief. Therefore, the treatment of AD still remains a high challenge and the development of new strategies is an active area of research.

Among the different traditional medicines known, curcumin is one of the most extensively investigated candidates. Curcumin is a hydrophobic polyphenol derived from the rhizome (turmeric) of the herb Curcuma longa and has been identified as the active principle of turmeric. Curcumin is a biphenolic compound with hydroxyl groups at the ortho-position on the two aromatic rings that are connected by a β-diketone bridge, containing two double bonds (dienone), which can undergo Michael addition, critical for some of the effects of curcumin [3], but contributing to chemical instability in aqueous solution [4]. Curcumin is also found to be photosensitive and requires careful handling. Although the application of turmeric in the treatment of a number of diseases is well documented in the books of Ayurveda, extensive research in the last decade has identified numerous cellular and molecular targets of curcumin. On several paradigms, curcumin has been shown to exhibit antioxidant, anti-inflammatory, metals chelator, antiamyloid, anti-tau, and neuroprotective activities (see review by [5]). For instance, several in vitro studies have demonstrated that curcumin inhibits amyloid-B (AB) oligomer formation and cell toxicity at micromolar concentrations, while in transgenic mouse models of AD, the administration of curcumin reduced AB plaques and AB oligomers, suppressed inflammation and oxidative damage, and improved cognitive deficits [6-11]. Curcumin is also a good inhibitor of the expression of inflammatory cytokines, cyclo-oxygenase-2, lipoxygenase, glycogen synthase-3ß [12], and iNOS, likely by the inhibition of JNK/AP-1 and NF- $\kappa$ B mediated gene transcription [13, 14]. Curcumin can also reduce neuroinflammation caused by activated microglia induced by AB deposition, which is involved in the physiopathology of AD [15]. Therefore, curcumin represents a promising compound for the treatment of AD. It has been hypothesized that its extensive use might account for the significantly lower prevalence of AD in the Asian-Indian population [16]. In spite of its efficacy and safety, curcumin has not yet been approved as a therapeutic agent due to its poor oral absorption in both humans and animals likely due to the hydrophobic nature of the molecule. Its low

bioavailability has raised several concerns and may limit its clinical applications [17]. For instance, when curcumin was given orally at a dose of 2 g/kg to rats, maximum serum concentration was only 0.23 µg/mL after 1 h and levels of curcumin declined rapidly and were unquantifiable within 3 to 6 h after intake [18]. In healthy volunteers exposed to oral curcumin at supra-therapeutic doses (10-12 g/day), plasma levels reached only 160 nM [19]. The percentage of curcumin absorbed remained constant regardless of the dose indicating that administration of more curcumin did not result in higher absorption [20]. The low bioavailability of curcumin in healthy volunteers may explain the lack of efficacy on several clinical trials conducted with curcumin in AD or in mild cognitive impairment patients [21, 22].

Hence, enhancement of curcumin solubility and/or stability following oral treatment represents a pharmacological challenge for its therapeutic applications. Several delivery strategies to overcome the poor bioavailability of curcumin have been studied, including adjuvants, liposomes, micelles, phospholipid complexes, and nanoparticles are currently being investigated to enhance the bioavailability and biological activity of curcumin.

In the last decade, nanotechnologies have been used to enhance the solubility and the stability of curcumin with promising results [23, 24]. Recently, several studies have demonstrated that the oral bioavailability of curcumin entrapped-nanoparticles is higher than free curcumin or curcumin administered with piperine as absorption enhancer (see recent reviews, [5, 24, 25]). Several studies have developed nanoparticles for which the oral bioavailability was increased by 2 to 22-fold with a longer half-life [17, 25-27]. Theracurmin, a new form of nanoparticles based-drug delivery system of curcumin with the mean size of 190 nm, has been shown to improve water solubility of curcumin and 30fold higher bioavailability than native curcumin after its oral administration [28]. In healthy human volunteers, a plasma curcumin level of 189 ± 48 ng/ml was observed after an administration of a dose of 150 mg of Theracurmin, which corresponds to the intake of 8 g of conventional curcumin [29]. Therefore, current trends in curcumin research consist on the development of delivery systems based on biodegradable polymers to increase its solubility, stability, and bioavailability for delivery of curcumin at or around targeted cells or tissues [30]. Among biodegradable polymers recently investigated poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) has been utilized as sustained-release drug delivery. The advantages of PLGA biodegradable polymer-based

drug delivery system include biocompatibility, controllable biodegradability, absorbability, low toxicity of the degradation end products, sustained release potential, ease of administration, patient compliance, optimized efficacy, localized drug delivery, and high local drug concentrations. In particular, PLGA copolymers have gained strong success, because their release properties can be easily tailored by varying composition (lactide/glycolide ratio) and molecular weight and are fully biodegradable [24]. However, the effects of PLGA-nanoparticle formulation with curcumin on neuronal cells remain poorly investigated.

In this study, we developed curcumin-loaded PLGA nanoparticles (Nps-Cur), characterized the morphology and particle size, evaluated the neuronal uptake, and analyzed the neuroprotective effects of Nps-Cur in protecting neuronal cells from reactive oxygen species (ROS) and also determined the *in vitro* pharmaco-kinetics.

#### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

Curcumin, Poly (lactide-co-glycolide) 65:35, and dimethylammonium bromide (DMAB), dialysis bag, hydrogen peroxide (H2O2), cell survival assays Tox-8 (Resazurin based), monochlorobimane (MCB), glutathione-S-transferase, minimal essential medium Eagle (MEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, sodium pyruvate, and anti-rabbit were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Cytotoxicity Detection Kit-LDH (lactate dehydrogenase) was from Roche Diagnostics (Laval, Ouebec, Canada). Ethyl acetate was purchased from Fisher (Ottawa, ON, Canada). 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCF-DA) was from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Nuclear proteins extraction kit was from Active Motif (California, USA). BCA protein estimation kit was from Pierce Biotechnology (Rockford, USA). Anti-Nrf2 and anti-CREB antibodies were from Abcam (Cambrige, MA, USA). All chemicals used were of analytical grade. MilliQ water was used for all the experiments.

#### Preparation of Nps and Nps-Cur

Among the various techniques available for the formulation of Nps, the choice of the method depends mainly on the solubility of the therapeutic moiety. Due to the hydrophobic properties of curcumin, Nps and Nps-Cur were prepared by an emulsion-diffusion-

evaporation method, as previously reported [31, 32] with slight modifications. Briefly, curcumin and polymer were dissolved in 9 ml of ethyl acetate while stirring for 1 h at 500 rpm. Then this organic phase was added in a drop wise manner to aqueous phase containing DMAB stabilizer (1% w/v) to form an emulsion. This emulsion was stirred for 1 h followed by homogenization (Polytron PT4000; Polytron Kinematica, Switzerlandchange) at 15000 rpm for 5 min to reduce droplet size. The emulsion was then diluted with water to a large volume for solvent diffusion. The resulting formulation was then rotary evaporated for 3 h to remove the organic phase under reduced pressure. Nps-Cur was carried out at 15% polymer weight. For the formulation of Nps, the same procedure was followed without curcumin.

#### PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF NANOFORMULATIONS

#### Dynamic light scattering (DLS) measurements

DLS measurements for determining the average size and size distribution of the Nps and Nps-Cur were performed using a NanoS90 (Malvern instruments). A dilute suspension of the prepared Nps or Nps-Cur was put in glass cuvette and analyzed. All the data analysis was performed in automatic mode. Measured size was presented as the average value of 5 measurements. The polydispersity index (PDI), having a value between 0 and 1 (0 being for monodispersed particles), was also obtained.

#### Transmission electron microscopy (TEM)

The morphology and the size of Nps and Nps-Cur were observed using TEM (Hitachi H-7100) at  $40,000 \times$  magnification. Briefly, a copper grid was placed on a drop ( $100 \mu$ L) of Nps or Nps-Cur for 5 min and air-dried. The grid was then immerged in water for 1 min, air-dried, and then stained by adding one drop of 3% (w/v) phosphotungstic (PTA). After 1 min, the excess of the staining solution was removed with filter paper and the grid was air-dried once again before loading in the microscope and photographed.

## Analysis of photophysical properties of curcumin encapsulated in nanoparticulates

Encapsulation and binding of curcumin in hydrophobic core of Nps-Cur formulation was further examined by spectroscopic analysis [33, 34]. We have measured the fluorescence spectra of both native curcumin (dissolved in acetonitrile) and PLGA for the spectroscopic experiments. Aqueous Nps-Cur solution was vortexed followed by sonication for I min to get well dispersed solution. Fluorescence emission spectra was recorded from 450 to 750 nm.

#### Entrapment efficiency of Nps-Cur

The percentage of drug incorporated during Nps-Cur preparation was determined by centrifuging the Nps-Cur at 20,000 rpm for 30 min and separating the supernatant. The pellet obtained was washed twice with water and dissolved in acetonitrile followed by the estimation of the drug by HPLC (Agilent Technologies 1200 series) equipped with an UV detector using an analytical column Eclipse XDB-C18 (4,6 mm ID × 250 mm, 5  $\mu$ m). Curcumin was eluted isocratically at a flow rate of 1 mL/min using mobile phase constituted by 40% phosphoric acid and 60% acetonitrile and detected at 420 nm. At this wavelength, there was no interference in the absorbance reading from the PLGA. The entrapment efficiency was calculated using the formula:

#### Drug entrapment (%) =

(Mass of drug in nanoparticles/Mass of drug

used in formulation) \* 100

Mean values were reported from 3 individual experiments.

#### In vitro release studies

The in vitro release of curcumin from the Nps-Cur was evaluated by dialysis membrane method. Briefly, 5 ml of the formulation was centrifuged at 20,000 rpm for 30 min at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet was suspended with 5 ml of MilliQ water. The process was repeated twice. Then the Nps-Cur solution was put in the pre-swelled dialysis bag with a 12-kDa molecular weight cutoff. The dialysis bag was suspended in 50 ml of the release medium (50% v/v of ethanol) at 37°C under a magnetic stirrer. At regular intervals starting at 5 min, 5 ml of samples were withdrawn and replaced with an equivalent amount of the fresh dissolution medium. The samples were then analyzed by HPLC as described above [34]. Ethanol was used in the release media to provide sink conditions as curcumin is insoluble in water [35]. To analyze the release kinetics and mechanism, data were fitted to the following mathematical models [23]: 1-Zero order

 $(M_t/M_{\alpha} = k_0 t)$ , 2-First order  $(M_t/M_{\alpha} = 1 - \exp(-k_1 t))$ and Higuchi model  $(M_t/M_{\alpha} = k_H t^{1/2})$ . Where  $M_t/M_{\alpha}$ is the fraction of drug release at time t and  $k_0$ ,  $k_1$  and  $k_H$  are zero order release constant, first order release constant and Higuchi constant respectively. The values of  $k_0$ ,  $k_1$ , and  $k_H$  were determined by fitting the release data into respective equations. The best fitting model is the one with the highest correlation coefficients. The concentration of curcumin released from the Nps-Cur was expressed as a percentage of the total curcumin present in the Nps-Cur and was plotted as a function of time.

#### CULTURE ASSAY

#### Cell line

SK-N-SH cells, a human neuroblastoma cell line from ATCC (Manassas, VA, USA), were maintained in MEM, supplemented with 10% (v/v) FBS, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and sodium pyruvate (1 mM) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were grown to 80% confluence and then seeded in multiwell cell culture plates for the experimental procedures.

#### In vitro cell viability assays in SK-N-SH cells

SK-N-SH cells were plated at a density of  $2.0 \times 10^4$  cells/well in 96-well plates and incubated for 24 h at 37°C. Cells were then starved and treated with 5, 10, and 15 µl of Nps and Nps-Cur corresponding to 0.035, 0.07, and 0.1 µM of curcumin, respectively. For co-treatment experiments, cells were treated with 500 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cell death and survival were assessed 24 h after the treatment using the Cytotoxicity Detection Kit-LDH and Tox-8 (Resazurin based) as per the manufacturer's instructions. Values obtained from controls, untreated cells, were considered as 100%.

#### Intracellular reactive oxygen species (ROS)

Intracellular ROS accumulation was measured by following the oxidation of 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCF-DA), a non-fluorescent, cell permeable dye which upon hydrolysis by intracellular esterase reacts with ROS to produce a highly fluorescent compound, 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), which is trapped inside the cells. Briefly, SK-N-SH cells  $(2 \times 10^4$ /well) were plated into 96 well plates and allowed to attach for 24 h. After 24 h, cells were starved and co-treated with 5  $\mu$ M of free curcumin used as positive control, Nps (10  $\mu$ L) or Nps-Cur (10  $\mu$ L) corresponding to  $0.07 \,\mu\text{M}$  of curcumin and  $1.0 \,\text{mM}$  of  $H_2O_2$  for 1 h. DCF-DA was added to a final concentration of  $10 \,\mu\text{M}$  for 20 min. Cells were then washed with PBS and the fluorescence was determined with the excitation/emission filters at 485/535 nm using a Synergy HT multidetection microplate reader.

## Curcumin uptake in SK-N-SH cells by fluorescence method

Curcumin is naturally fluorescent in the visible green spectrum. In order to study the qualitative cellular uptake of the Nps-Cur, SK-N-SH cells were cultured on cover slips coated with poly-D-lysine at a density of 1.5 × 10 cells/well in 24-well plates. Cells were incubated for 24 h at 37°C and then treated with 5 µM of free curcumin (used as positive control) and Nps (10 µL) or Nps-Cur (10 µL) corresponding to 0.07 µM of curcumin for 1 h. After incubation, cells were rinsed three times with 1 ml of PBS containing Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> to remove excess of Nps, Nps-Cur, and free curcumin. Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde and the nuclei stained with 1 µg/ml DAPI for 15 min. The glass slides were mounted with prolong gold antifade reagent and observed under a fluorescence microscopy (Leica ECB, Germany). Images were captured using a camera (SensiCam high performance) and Image-Pro plus version 5.0 software (Media Cybernetics, USA) under a FITC filter. For the confocal fluorescence analysis, cells were examined with an oil immersion Nikon Plan Apo 100 objective mounted onto a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon, Melville, NY, USA) equipped with a Bio-Rad Radiance 2000 confocal imaging system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

#### Protein extraction

SK-N-SH cells were treated with 1 mM of  $H_2O_2$  and 0.07  $\mu$ M of free curcumin, Nps, or Nps-Cur at volume corresponding to 0.07  $\mu$ M of free curcumin for 30 min. SK-N-SH cells total proteins were extracted with a lysis buffer containing a cocktail of protease inhibitors and nuclear proteins were extracted using a kit from Active Motif. Total and nuclear proteins were quantified using the BCA test.

#### Determination of glutathione (GSH) level

Total proteins (50  $\mu$ g) were transferred to 96-well plate, then 100  $\mu$ L of MCB at 200  $\mu$ M was added in each well and the reaction was started with 50  $\mu$ L of

GST at a final concentration of 1 U/mL. After 30 min of incubation at 37°C, the fluorescence was recorded with  $\lambda$ ex at 360 nm and  $\lambda$ em at 460 nm using a Synergy HT multi-detection microplate reader.

#### Western blot analysis

Nuclear proteins  $(40 \ \mu g)$  were separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked for 1 h in TBS with 5% skim milk and incubated with primary antibodies anti-Nrf2 (1/1000) or anti-CREB (1/1000) followed by the secondary antibody HRP-conjugated anti-rabbit (1/5000). CREB was used as protein loading control. Detection was realized with Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate and the bands were visualized and quantified by densitometric analysis using luminescent imaging system FluorChem.

#### Statistical analysis

All data were expressed as means  $\pm$  SD from at least three independent experiments performed at least in triplicate. Statistical analysis was performed by a Dunnett's test. For Western-blot analysis, one-way ANOVA followed by Tukey test was used. The level of significance was considered when p < 0.05.

#### RESULTS

### Physicochemical properties and morphology of Nps and Nps-Cur

In order to ascertain compatibility between the drug and the polymer used, solutions of drug alone in acetonitrile ( $5 \mu g/ml$ ) (Fig. 1B), PLGA ( $10 \mu g/ml$ ) in acetonitrile (Fig. 1A), and a mixture of PLGA solution (95% v/v) and curcumin (5% v/v) in acetonitrile (Fig. 1C) were made and scanned from 200 nm to 800 nm. The UV spectra given in Fig. 1 indicated that the pattern of the mixture of PLGA and curcumin was similar to the pattern obtained with native curcumin. These results indicate that curcumin is not modified in the presence of PLGA.

To confirm the solubility of our formulation, Nps-Cur dissolved in aqueous solution gave a clear, well-dispersed formulation with curcumin natural color (Fig. 2B) confirming the solubility of our formulation. In contrast, native curcumin is poorly soluble in aqueous solution as undissolved curcumin is visible on the water's surface (Fig. 2A). PLGA is not



Fig. 1. Ultraviolet–Visible absorbance spectrum of PLGA and native curcumin in acetonitrile. Scan of (A) PLGA (10 µg/ml), (B) native curcumin (5 µg/ml), and (C) mixture of PLGA solution (95% v/v) and curcumin (5% v/v).

soluble in water due to its hydrophobic character (Fig. 2C) while Nps are completely dispersed in water (Fig. 2D).

DLS was used to evaluate the size and size distribution of the Nps and Nps-Cur. Figure 3A, B shows a narrow size distribution of the Nps and Nps-Cur ranging from 80 to 120 nm, with the mean particles at 100 nm. The PDI obtained from DLS was within the permissible range and remained below 0.25 thus indicating a homogeneous formulation. The size of prepared Nps and Nps-Cur was also estimated by TEM and is indicated in Fig. 3C, D. Nps and Nps-Cur revealed their regular spherical shape. It is interesting to note that the morphology and the size of Nps-Cur are similar to Nps. The small particle size of the Nps and Nps-Cur prepared can be attributed to the presence of DMAB, which is reported to produce comparatively smaller particle size as compared to other stabilizers like polyvinyl alcohol (PVA). The entrapment efficiency was calculated to be 31%.

To confirm the encapsulation as well as binding of curcumin in the hydrophobic core of Nps-Cur formulation, the photophysical property of curcumin was taken into consideration. The fluorescence spectra analysis of curcumin (from 450 to 700 nm) with excitation wavelength 420 nm was carried out and showed that native curcumin in methanolic solution exhibited a sharp fluorescence peak at 522 nm (Fig. 4A), but the fluorescence spectrum of Nps-Cur was shifted towards blue spectrum and showed a well defined peak at 491 nm (Fig. 4B). This blue shift could be due to the binding of curcumin within hydrophobic domain of PLGA present in Nps-Cur formulation [34].

#### Stability studies

The stability of Nps-Cur is important because it determines the expiration date of a particular formulation. The optimized Nps-Cur were evaluated for physical and chemical stability according to International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines after storage for 6 months. Nps-Cur were stored at 4°C away from light and evaluated for particle size, morphology, and drug content. There were negligible alterations in the values of optimized Nps-Cur after storage for 6 months under the given conditions. The total drug content in Nps-Cur was 56.5  $\mu$ g/ml and 58.3  $\mu$ g/ml, after a week and 6 months of storage,

382



Fig. 2. Solubility of curcumin and PLGA (native and in formulation) in water. Solution of free curcumin (A), Nps-Cur (B), native PLGA (C), and Nps (D).



Fig. 3. Size and morphological characterization of Nps and Nps-Cur using dynamic laser light scattering (DLS) and transmission electron micrograph (TEM). DLS analysis of polymeric Nps (A) and Nps-Cur (B) and TEM photographs of Nps (C) and Nps-Cur (D).



Fig. 4. Analysis of photophysical properties of native curcumin and Nps-Cur. Fluorescence spectrum of native curcumin in methanolic solution (A) and fluorescence spectrum of Nps-Cur in aqueous solution (B).

respectively. Results from TEM showed no differences in the size and morphology of the 1 week and 6 months old Nps-Cur. These results indicate that the developed Nps-Cur are physically and chemically stable and retain their pharmaceutical properties over a period of at least 6 months.

#### In vitro release studies of Nps-Cur

The method of dynamic dialysis was carried out to study the release property of curcumin from Nps-Cur. Due to low solubility of curcumin in water, 50% v/v of ethanol was used in which the solubility of curcumin was  $0.693 \pm 0.13$  mg/mL [36]. Figure 5 represents the release profile of curcumin from Nps-Cur. Curcumin released from the nanoformulation appeared to have two components. The first phase is an initial exponential phase releasing 74% of the drug in 6h followed by a slow release phase releasing up to 81% of the drug in the next 16h. The calculated values of release constants are determined by fitting the release data into respective equations along with regression coefficients  $(R^2)$  given in Table 1. To find out the mechanism of curcumin release from the Nps-Cur, we analyzed regression coefficients obtained by fitting the data into different release models. It was concluded that Higuchi model best fitted the release kinetics data of curcumin with a  $R^2$  value of 0.9484 and therefore the release of the drug from the formulation was mainly diffusion mediated.

#### Nps-Cur uptake by SK-N-SH cells

Development of Nps-Cur as an efficient delivery system would depend on their efficient internalization into and sustained retention inside cells. Curcumin is a polypenolic compound with a photochemical property. We took the advantage of this property to investigate the ability of Nps-Cur to be taken up by SK-N-SH cells.



Fig. 5. In vitro release kinetics studies. In vitro release kinetics of curcumin from Nps-Cur in 50% v/v of ethanol at  $37^{\circ}$ C. Values reported are mean  $\pm$  SD from 3 different experiments.

Table 1
Release parameters for curcumin in nanoformulation obtained after
fitting the in vitro release data to different release models

Parameters	Mathematic model for drug release kinetics		
	Zero order	First order	Higuchi model
к	13.108	0.2409	35.414
R <sup>2</sup>	0.8954	0.643	0.9484

For this, cells were incubated at 37°C with 10 µl of Nps-Cur (corresponding to the 0.07 µM of curcumin), for 1 h and the cellular uptake was determined by fluorescence microscopy. Results showed that Nps-Cur was taken up 1 h after exposure (Fig. 6D). The internalized Nps-Cur were seen throughout the cytoplasm surrounding the nucleus and in dendrites. Interestingly, by confocal microscopy, the fluorescence was also observed in the nucleus (Fig. 6E). Cells incubated without treatment (negative control) and with Nps do not display fluorescence while in the presence of free curcumin at 5 µM, used as positive control, cells display a green fluorescence due to the rapid internalization and accumulation of curcumin by cells (Fig. 6A-C). These results demonstrated that Nps-Cur are effectively taken up by neuronal cells.





Fig. 6. Cellular uptake of native curcumin, Nps, and Nps-Cur in SK-N-SH cells. Cell nuclei were stained with DAPI (bluc) and cellular uptake of curcumin or Nps-Cur (green fluorescence) was monitored by fluorescence (A-D) and confocal (E) microscopy. SK-N-SH cells were treated for 1 h at 37°C with water (A), Nps (B), 5 µM of curcumin used as positive control (C), and Nps-Cur (D, E).

#### Nps-Cur protect SK-N-SH cells

A very important aspect of the investigation of new polymeric nanoparticle formulation delivery systems and particularly for brain delivery is the analysis of their toxicity upon target cells. We have then evaluated the toxicity of Nps and Nps-Cur on SK-N-SH cells. Different doses of Nps and Nps-Cur were added to cell culture medium, and then cell death and survival were analyzed by Resazurin and LDH assays. Data on Resazurin assay showed that the number of cell survival was significantly reduced in the presence of Nps and Nps-Cur (Fig. 7B). However, this assay reflects metabolic activity and we cannot exclude the possibility of an effect of Nps and Nps-Cur on the cell metabolic activity. The potential toxicity of Nps and Nps-Cur was then completed on LDH assay and data indicated that both Nps and Nps-Cur are non toxic (Fig. 7A). Next, we have investigated the neuroprotective potential of Nps-Cur by challenging SK-N-SH cells with 500 µM of H2O2 for 24 h. Results showed that 10 µl of Nps and Nps-Cur formulations protect cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with higher protection observed in the presence of Nps-Cur while native curcumin at 0.07 µM, corresponding to the concentration obtained in 10 µl of the Nps-Cur preparation, was not able to protect cells against H2O2 (Fig. 7C, D). These colorimetric assays were confirmed by microscopic examination of cell morphology. As shown in Fig. 8,

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells became round (Fig. 8B), detached from the bottom, and aggregated compared to control (Fig. 8A), Nps (Fig. 8C), or Nps-Cur (Fig. 8D) treated cells. These results confirm that Nps as well as Nps-Cur are nontoxic to neuronal SK-N-SH cell line.

#### Nps-Cur decreased ROS levels in SK-N-SH cells

The antioxidant activity of curcumin has been demonstrated on different paradigm. To determine the antioxidant effect of Nps-Cur, SK-N-SH cells were treated with 10  $\mu$ l of Nps and Nps-Cur. At the end of 1 h of treatment, the intensity of the fluorescence of DCF was significantly lower in the presence of Nps and Nps-Cur (Fig. 9A). Interestingly, when cells were challenged with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the effect of Nps-Cur was higher than Nps and is similar to the effect of curcumin at 5  $\mu$ M, used as positive control (Fig. 9B). These results indicate that Nps-Cur formulation retains the ability to degrade ROS.

## Effect of Nps-Cur on glutathione levels in SK-N-SH cells

GSH is the major endogenous antioxidant produced by the cells, participating directly in the neutralization of free radicals and ROS. Our results showed that 30 min incubation with  $H_2O_2$  at 1 mM induced a rapid and significant reduction of GSH in SK-N-SH cells.



Fig. 7. Effects of Nps and Nps-Cur on cell death and viability with or without  $H_2O_2$ . Effects of different doses of Nps and Nps-Cur on SK-N-SH cells death analyzed by LDH assay (A, C), on cells survival analyzed by Resazurin assay (B, D) 24 h after different treatments. 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, and 15  $\mu$ L of Nps-Cur correspond to 0.035  $\mu$ M, 0.07  $\mu$ M, and 0.1  $\mu$ M of curcumin, respectively. Results are expressed as percentage of control (considered as 100%). Data are means ± SD from at least three separate experiments performed in sixtuplate for each group. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 versus control (A, B) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group (C, D).

Interestingly, in the presence of Nps-Cur, the decrease of GSH induced by  $H_2O_2$  was prevented (Fig. 10). The effect of Nps-Cur is similar to curcumin at 0.07  $\mu$ M. However, this result is of great interest because, as described above, the stability of curcumin in Nps-Cur is longer (at least 6 months) as compared to free curcumin.

#### Nps-Cur suppressed the activation of Nrf2

Nrf2 plays an important role in the control of the cellular redox potential by binding to antioxidant response elements and phase 2 enzymes. Based on the effect of Nps-Cur on ROS and GSH levels, we have then investigated the effect of Nps-Cur on the activity of Nrf2. For this, SK-N-SH cells were challenged with  $H_2O_2$  at 1 mM for 30 min and the level of Nrf2 in the nucleus fraction was measured by Western blot. The activity of Nrf2 induced by  $H_2O_2$  was prevented in the presence of curcumin and Nps-Cur with higher efficacy in the presence of Nps-Cur (Fig. 11). Nps-Cur was as potent as curcumin at 0.07  $\mu$ M, the equivalent concentration of curcumin in Nps-Cur. In these conditions, Nps did not have any effect on the activity of Nrf2.

#### DISCUSSION

Curcumin has been shown to display complex and multifaceted activities as an antioxidant, antiinflammatory, and anti-amyloid agent. Therefore, it represents one of the most promising compounds for the treatment of AD. Despite its *in vitro* and *in vivo* efficacy and safety, the clinical and therapeutic applications of curcumin have been limited by its insolubility in water and poor bioavailability. Using nanotechnology, some studies have demonstrated higher efficacy and bioavailability of curcumin on different paradigms. The choice of carrier material in the oral delivery system is of high importance because it significantly

386



Fig. 8. Photomicrographs of SK-N-SH cells after 24 h of treatment with (A) H<sub>2</sub>O, (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), (C) Nps (10 µl), and (D) Nps-Cur (10 µl) at 400× magnification.



Fig. 9. Effects of Nps and Nps-Cur on ROS levels. Effect of Nps and Nps-Cur on the intensity of the fluorescence of DCF analyzed 1 h after the treatment of SK-N-SH cells in the absence (A) or in the presence of 1.0 mM of  $H_2O_2$  (B). Results are expressed as percentage of control (considered as 100%). Data are means  $\pm$  SD from at least three separate experiments performed in sixplicate with \*\*p < 0.01 versus control (A) or  $H_2O_2$  group (B).

affects the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the drugs. The biocompatibility of the polymer used is another important parameter, and encapsulating hydrophobic drugs in the polymer PLGA represents a promising strategy for sustained and controlled drugdelivery. Indeed, PLGA polymers are characterized by their biocompatibility and biodegradability; it is first degraded into its monomers, lactic and glycolic acid, which then enter the tricarboxylic acid cycle (Krebs' cycle), are metabolized and subsequently, eliminated from the body as carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and water (H<sub>2</sub>O) [37, 38]. PLGA is used as an emulsifier and flavoring agent in the food industry and a pharmaceutical excipient. Finally, they have been approved



Fig. 10. Effects of curcumin, Nps, and Nps-Cur on the level of GSH. SK-N-SH cells were co-treated with curcumin, Nps, or Nps-Cur and 1 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min. GSH levels were determined on proteins from lysed cells. Results are expressed as percentage of control (considered as 100%). Data are means  $\pm$  SD of at least three separate experiments performed in triplicate for each group. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group.

by the U.S. Food and Drug Administration for pharmaceutical application. PLGA may enhance the oral absorption and bioavailability of curcumin by bypassing the P-glycoprotein-mediated efflux pump. It has been demonstrated that the mean permeability of curcumin coperfused with PLGA (1:9) was 3 times that of free curcumin in the jejunum [27]. The nanoparticles properties are typically strongly influenced by the preparation procedure.

We have prepared Nps-Cur by an emulsiondiffusion-evaporation method, characterized the physico-chemical properties of nanoparticles, which represent important parameters to consider as they influence physical stability, release kinetics, cellular uptake, and intracellular trafficking. The successful

binding of curcumin to the hydrophobic domain of PLGA-nanoparticles was confirmed by the blue shift fluorescence spectrum of Nps-Cur [34]. The size of the prepared nanoparticles is also an important characteristic [39] because of potential side effects. Indeed, nanoparticles with the size greater than 100 nm are easily captured by Küpffer cells or other phagocytic cells which thus restricts their biodistribution [40] or can lead to pulmonary toxicity, in addition to limit their access to the brain [41]. Our Nps and Nps-Cur displayed a narrow size distribution ranging from 80 to 120 nm, with the mean particles at 100 nm. The size of our nanoparticles is in the range to avoid opsonization [42], resulting in prolonged duration of action as well as enhancing the drug to specific sites [43]. The size of nanoparticles is influenced by the stabilizers [25]. Our formulation used an aqueous phase containing DMAB as stabilizer. Usually, PVA is widely used as stabilizer for PLGA polymers. The use of DMAB as stabilizer allows the formation of smaller sized particles compared to PVA 144. 45]. In addition to the particle size, the distribution of the particle size could impact on the regular pharmacokinetic parameters. Indeed, a value of size distribution or PDI > 0.3 indicates that the distribution of the particle size is large and heterogeneous. The PDI of our nanoformulation was below 0.25 thus indicating a homogenous formulation. These results suggest that the quantity of Nps-Cur taken up by each cell will be similar. Therefore, the concentration of curcumin released from the nanoparticles in each cell will be the same. The encapsulation efficiency of compound on nanoparticles is an important property for drug delivery system. This parameter is linked to PLGA concentration, molecular weight, the ratio



Fig. 11. Effects of Nps and Nps-Cur on the nuclear expression of Nrf2. SK-N-SH cells were co-treated with curcumin (0.07  $\mu$ M), Nps, or Nps-Cur (10  $\mu$ I) in the presence of 1 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min then Nfr2 expression was determined by Western blot on the nuclear fraction. CREB was used as a marker for equal protein loading in each well. Bar graph represents the means ± SD from three separate experiments with \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 versus control group and  $\frac{#}{p} < 0.05$  versus Nps-Cur group.

lactic/glycolic acid, and the nature of the stabilizer used [46]. We have successfully encapsulated 31% of curcumin into PLGA-nanoparticle.

One of the most important findings of our study is the huge elevation of the stability and the solubility of the Nps-Cur. These results are consistent with other studies [27, 34]. Indeed, it has been reported that 90% of free curcumin is degraded after 30 min in phosphate buffer (0.01 M, pH 7.4) [47]. In vitro release study of Nps-Cur presents a biphasic release profile. The initial exponential phase was probably due to the release of curcumin which was either close and/or adsorbed on the surface of the Nps-Cur. The slow release phase was due to the diffusion of the dissolved drug within the core of the PLGA of the Nps-Cur into the release medium followed by the degradation of polymer matrix. The exponential release pattern of drugs from the PLGA-nanoparticles has also been reported [48, 49]. Similar trends of release were also described with curcumin entrapped in glycerol monooleate or PLGA-based nanoparticles [25, 34]. The prediction of the release profile is complex because it results from a combined effect of various parameters: solid-state drug polymer solubility [50] and drug-polymer interactions [51], polymer degradation rate [52], polymer molecular weight and PDI [53]. The release of drug from the drug-loaded particles depends also on the drugto-polymer ratio [42] as it has been observed that the release was faster from those nanoparticles with higher drug content [54]. A number of other mechanisms such as desorption of the surface bound or adsorbed drug, diffusion of the drug from the polymer matrix, surface and bulk degradation and combined degradation and diffusion process have been reported to explain the release of the drug from the biodegradable particles [55]. PLGA is reported to undergo bulk degradation with the release of the drug occurring mainly both by diffusion and degradation of the matrix itself [56].

Neuronal cellular uptake of Nps-Cur is a crucial property to consider for their neuroprotective activity. Our *in vitro* cellular uptake results demonstrated a better uptake of Nps-Cur in SK-N-SH cells compare to free curcumin. These data are in agreement with a report by Anand et al. [17] that showed higher cellular uptake of curcumin loaded nanoparticles in human chronic myeloid leukemia KBM-5 than free curcumin. The uptake of PLGA-nanoparticles has been demonstrated to be through an endocytic process and the uptake is time-and-concentration dependent and could be saturable [57]. Time-dependent studies also showed that following their uptake, nanoparticles were transported to endosomes (see review, [58]), then nanoparticles escaped from lysosomes within 10 min of incubation and entered into the cytoplasm. The therapeutic efficacy of the PLGA-nanoparticles could be due to their ability to protect therapeutic agent from degradation due to lysosomal enzyme. In accordance with these results, our results on neuronal cells demonstrated that after a 60 min of incubation, Nps-Cur were widely distributed in the cytosol and in the nucleus. More studies are required to better understand the factors that affect the cellular uptake of nanoparticles, and their intracellular trafficking to further explore the drug delivery application of nanoparticles.

Another important factor to consider is the potential toxicity of these Nps-Cur, which will limit the dose of the drug that could be delivered. On LDH assay, our results demonstrated that our Nps or Nps-Cur formulation is not toxic to neuronal cells. However, data obtained from the Resazurin assay suggest that nanoparticles could reduce SK-N-SH cells metabolic activity. It has been noted that some types of nanoparticles could reduce cells activity by directly targeting mitochondria activity and may generate injurious responses [59]. However, in the presence of curcumin, we cannot exclude the possibility of a decrease of cell survival due to the inhibition of the Akt pathway [60]. The divergent effect of Nps-Cur on cell survival in the absence or in the presence of H2O2 could be due to the upregulation of different cellular protective enzymes (heme oxygenase-1, thioredoxin) or pathways (Nrf2) induced by H2O2

In AD, ROS play an important role in inflammatory, neuronal damage, and cell death. Oxidative stress is also suggested to play an important role early in the pathophysiology of AD, preceding amyloid deposition and toxicity [61-63]. Therefore, an ideal strategy to effectively neutralize ROS is to successfully deliver antioxidants to inter- and intracellular compartments in brain, as well as to maintain the enzyme activity to neutralize the effect of free radicals that are formed over time. PLGA-nanoparticles has been demonstrated to be an effective system to deliver at a sustained rate the antioxidant curcumin in the brain with higher accumulation in hippocampus 1 h after an i.v., administration of PLGA-nanoparticles [26]. The hippocampus is well-known to play an important role in learning and memory and is degenerated in AD. Moreover, oxidative stress and neuroinflammation are elevated in the hippocampus from AD and mild cognitive impairment patients. However, the antioxidant activity of curcumin loaded nanoparticles on neuronal cells is poorly investigated. Our data demonstrated that 0.07 µM of curcumin entrapped in Nps-Cur decreased ROS levels

as efficiently as 5 µM of free curcumin. Our results strengthen the protective effect of curcumin entrapped in Nps previously described on SK-N-SH cells with different doses of NanoCurc<sup>™</sup> (1 nM to 5 µM) [64]. Regarding the effects of Nps and Nps-Cur on ROS levels, several nanoparticles have been shown to interfere with ROS [59]. For instance, chitosan-nanoparticles have been shown to interfere with ROS levels [65, 66], while fullerenes-nanoparticles composed by carbon has been shown to have an antioxidant effect by scavenging the free radicals [67]. Until now, there is no data available on the interaction between PLGAnanoparticles and free radicals because in numerous studies on PLGA-nanoparticles, data on the void nanoparticles were missing [17, 68-70]. Interestingly, our data revealed that our Nps can decrease ROS levels in SK-N-SH cells likely due to the recombination between peroxyl free radicals PLGA chains [71]. However, more studies are required to better understand the relationship between the surface area of nanoparticles and ROS levels.

The antioxidant activity displayed by the Nps-Cur in neuronal cells was also confirmed by the prevention of the decrease of the GSH levels induced by H2O2. The antioxidant effect of Nps-Cur was similar to free curcumin at 0.07 µM. However, as described above, the entrapped curcumin is highly stable and considering the sustained release of curcumin by nanoparticles, the effect obtained with Nps-Cur on GSH level should occur for a longer period. Finally, based on the effect of Nps-Cur on ROS and GSH levels, we have then investigated the effect of Nps-Cur on the activity of Nrf2. Our results also showed that Nps-Cur was as effective as free curcumin in the prevention of the induction of the activity of Nrf2 induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. These results are of great interest because many studies clearly demonstrate that activation of Nrf2 target genes in astrocytes and neurons is strongly protective against inflammation, oxidative damage, and cell death.

#### CONCLUSION

The enhancement of the solubility of curcumin as well as its stability will bring it to the forefront of therapeutic applications. SK-N-SH neuronal cells were used in this study to analyze the uptake of Nps-Cur with the aim to target neuronal cells using a biodegradable and biocompatible polymer. We have successfully formulated and characterized Nps and Nps-Cur. Our results show that the Nps and Nps-Cur formulations had a size around 100 nm, the optimum size range for cellular uptake [72]. The stability of Nps-Cur was observed until 6 months of storage and the kinetic of the release of curcumin from the nano-formulation is biphasic. Nps-Cur are significantly taken up by SK-N-SH cells with the fluorescence distributed in the cytoplasm and the nucleus. Our Nps and Nps-Cur are not toxic to neuronal cells and can protect SK-N-SH cells against H2O2-induced toxicity and prevent ROS elevation, GSH decrease, and the activation of Nrf2. Taken together, these data are of great interest because, in physiological conditions, the stability of Nps-Cur is longer than native curcumin. Thus, PLGAnanoparticles provided an efficient delivery system for encapsulated curcumin. Overall, our results indicate that Nps-Cur have the capacity to protect human neuronal cells against oxidative damage as observed in AD. This formulation is likely to have a great potential for pharmacological application in neurodegenerative disorders such as AD.

#### DISCLOSURE STATEMENT

Authors' disclosures available online (http://www.jalz.com/disclosures/view.php?id=1174).

#### REFERENCES

- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menczes PR, Rimmer E, Scazufca M (2005) Global prevalence of dementia: A Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112-2117.
- [2] Giacobini E (2000) Cholinesterase inhibitors stabilize Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci 920, 321-327.
- [3] Weber WM, Hunsaker LA, Gonzales AM, Heynekamp JJ, Orlando RA, Deck LM, Vander Jagt DL (2006) TPAinduced up-regulation of activator protein-1 can be inhibited or enhanced by analogs of the natural product curcumin. *Biochem Pharmacol* 72, 928-940.
- [4] Pan MH, Huang TM, Lin JK (1999) Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. Drug Metab Dispos 27, 486-494.
- [5] Abdenour B, Doggui S, Dao L, Ramassamy C (2011) Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer's discasc. *Expert Rev Mol Med* 13, 1-15.
- [6] Garcia-Alloza M, Borrelli LA, Rozkalne A, Hyman BT, Bacskai BJ (2007) Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. J Neurochem 102, 1095-1104.
- [7] Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM (2001) The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. J Neurosci 21, 8370-8377.
- [8] Frautschy SA, Hu W, Kim P, Miller SA, Chu T, Harris-White ME, Cole GM (2001) Phenolic anti-inflammatory antioxidant

reversal of A beta-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol Aging* 22, 993-1005.

- [9] Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kayed R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid *in vivo. J Biol Chem* 280, 5892-5901.
- [10] Yanagisawa D, Taguchi H, Yamamoto A, Shirai N, Hirao K, Tooyama 1 (2011) Curcuminoid binds to amyloid-beta1-42 oligomer and fibril. J Alzheimers Dis 24(Suppl 2), 33-42.
- [11] Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M (2004) Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's betaamyloid fibrils in vitro. J Neurosci Res 75, 742-750.
- [12] Bustanji Y, Taha MO, Almasri IM, Al-Ghussein MA, Mohammad MK, Alkhatib HS (2009) Inhibition of glycogen synthase kinase by curcumin: Investigation by simulated molecular docking and subsequent in vitrolin vivo evaluation. J Enzyme Inhib Med Chem 24, 771-778.
- [13] Wang HM, Zhao YX, Zhang S, Liu GD, Kang WY, Tang HD, Ding JQ, Chen SD (2010) PPARgamma agonist curcumin reduces the amyloid-beta-stimulated inflammatory responses in primary astrocytes. J Alzheimers Dis 20, 1189-1199.
- [14] Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC (2003) Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 23, 363-398.
- [15] Zekry D, Epperson TK, Krause KH (2003) A role for NOX NADPH oxidases in Alzheimer's disease and other types of dementia? *IUBMB Life* 55, 307-313.
- [16] Ganguli M, Dodge HH, Chen P, Belle S, DeKosky ST (2000) Ten-year incidence of dementia in a rural elderly US community population: The MoVIES Project. *Neurology* 54, 1109-1116.
- [17] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB (2007) Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Mol Pharm* 4, 807-818.
- [18] Perkins S, Verschoyle RD, Hill K, Parveen I, Threadgill MD, Sharma RA, Williams ML, Steward WP, Gescher AJ (2002) Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 535-540.
- [19] Mancuso C, Siciliano R, Barone E (2011) Curcumin and Alzheimer disease: This marriage is not to be performed. J Biol Chem 286, lc3; author reply lc4.
- [20] Ravindranath V, Chandrasekhara N (1981) Metabolism of curcumin-studies with [3H]curcumin. Toxicology 22, 337-344.
- [21] Baum L, Lam CW, Cheung SK, Kwok T, Lui V, Tsoh J, Lam L, Leung V, Hui E, Ng C, Woo J, Chiu HF, Goggins WB, Zee BC, Cheng KF, Fong CY, Wong A, Mok H, Chow MS, Ho PC, Ip SP, Ho CS, Yu XW, Lai CY, Chan MH, Szeto S, Chan IH, Mok V (2008) Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. J Clin Psychopharmacol 28, 110-113.
- [22] Ringman JM, Younkin SG, Pratico D, Seltzer W, Cole GM, Geschwind DH, Rodriguez-Agudelo Y, Schaffer B, Fein J, Sokolow S, Rosario ER, Gylys KH, Varpetian A, Medina LD, Cummings JL (2008) Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease. *Neurology* 71, 85-92.
- [23] Belkacemi A, Doggui S, Dao L, Ramassamy C (2011) Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. Expert Rev Mol Med 13, e34.
- [24] Sahni JK, Doggui S, Ali J, Baboota S, Dao L, Ramassamy C (2011) Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease. J Control Release 152, 208-231.

- [25] Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, Singh D, Kumar MN (2009) Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *Eur J Pharm Sci* 37, 223-230.
- [26] Tsai YM, Chien CF, Lin LC, Tsai TH (2011) Curcumin and its nano-formulation: The kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration. Int J Pharm 416, 331-338.
- [27] Xie X, Tao Q, Zou Y, Zhang F, Guo M, Wang Y, Wang H, Zhou Q, Yu S (2011) PLGA nanoparticles improve the oral bioavailability of curcumin in rats: Characterizations and mechanisms. J Agric Food Chem 59, 9280-9289.
- [28] Sasaki H, Sunagawa Y, Takahashi K, Imaizumi A, Fukuda H, Hashimoto T, Wada H, Katanasaka Y, Kakeya H, Fujita M, Hasegawa K, Morimoto T (2011) Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. *Biol Pharm Bull* 34, 660-665.
- [29] Kanai M, Imaizumi A, Otsuka Y, Sasaki H, Hashiguchi M, Tsujiko K, Matsumoto S, Ishiguro H, Chiha T (2011) Dose-escalation and pharmacokinetic study of nanoparticle curcumin, a potential anticancer agent with improved bioavailability, in healthy human volunteers. *Cancer Chemother Pharmacol* 69, 65-70.
- [30] Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN, Aggarwal BB (2008) Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol* 76, 1590-1611.
- [31] Kreuter J (1994) Drug targeting with nanoparticles. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 19, 253-256.
- [32] Hariharan S, Bhardwaj V, Bala I, Sitterberg J, Bakowsky U, Ravi Kumar MN (2006) Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: A potential oral delivery system for hormone therapy. *Pharm Res* 23, 184-195.
- [33] Sahu A, Bora U, Kasoju N, Goswami P (2008) Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. Acta Biomater 4, 1752-1761.
- [34] Mohanty C, Sahoo SK (2010) The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. Biomaterials 31, 6597-6611.
- [35] Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, Singh D, Kumar MNVR (2009) Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *Eur J Pharm Sci* 37, 223-230.
- [36] Kakkar V, Singh S, Singla D, Kaur IP (2011) Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin. *Mol Nutr Food Res* 55, 495-503.
- [37] Mittal G, Carswell H, Brett R, Currie S, Kumar MN (2011) Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology. J Control Release 150, 220-228.
- [38] Maurus PB, Kaeding CC (2004) Bioabsorbable implant material review. Operative Techn Sports Med 12, 158-160.
- [39] Davis SS (1997) Biomedical applications of nanotechnologyimplications for drug targeting and gene therapy. *Trends Biotechnol* 15, 217-224.
- [40] Wisse ELA (1984) Structural elements determining transport and exchange process in the liver. In Microspheres and drug therapy, pharmaceutical, immunological and medical aspects. Davis SS, Illum L, McVie JG, Tomlinson E, eds. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-23.
- [41] Sonavane G, Tomoda K, Makino K (2008) Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration:

Effect of particle size. Colloids Surf B Biointerfaces 66, 274-280.

- [42] Allemann E, Leroux JC, Gurny R, Doelker E (1993) In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DLlactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm Res* 10, 1732-1737.
- [43] Banerjee T, Mitra S, Kumar Singh A, Kumar Sharma R, Maitra A (2002) Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* 243, 93-105.
- [44] Sonaje K, Italia JL, Sharma G, Bhardwaj V, Tikoo K, Kumar MN (2007) Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. *Pharm Res* 24, 899-908.
- [45] Swarnakar NK, Jain AK, Singh RP, Godugu C, Das M, Jain S (2011) Oral bioavailability, therapeutic efficacy and reactive oxygen species scavenging properties of coenzyme Q10-loaded polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 32, 6860-6874.
- [46] Wischke C, Schwendeman SP (2008) Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. Int J Pharm 364, 298-327.
- [47] Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsich CY, Lin JK (1997) Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal* 15, 1867–1876.
- [48] Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS (1999) PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release* 57, 171-185.
- [49] Saxena V, Sadoqi M, Shao J (2004) Enhanced photo-stability, thermal-stability and aqueous-stability of indocyanine green in polymeric nanoparticulate systems. J Photochem Photobiol B 74, 29-38.
- [50] Panyam J, Williams D, Dash A, Leslie-Pelecky D, Labhasetwar V (2004) Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. J Pharm Sci 93, 1804-1814.
- [51] Lee J, Cho EC, Cho K (2004) Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,Llactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles. J Control Release 94, 323-335.
- [52] Horisawa E, Hirota T, Kawazoe S, Yamada J, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y (2002) Prolonged antiinflammatory action of DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres containing betamethasone sodium phosphate for an intra-articular delivery system in antigen-induced arthritic rabbit. *Pharm Res* 19, 403-410.
- [53] Matsumoto J, Nakada Y, Sakurai K, Nakamura T, Takahashi Y (1999) Preparation of nanoparticles consisted of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) and their evaluation in vitro. Int J Pharm 185, 93-101.
- [54] Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KP, Ramasamy M, Suresh B (2010) Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. *Nanomedicine* 6, 144-152.
- [55] Sinha VR, Trehan A (2003) Biodegradable microspheres for protein delivery. J Control Release 90, 261-280.
- [56] Makino K, Mogi T, Ohtake N, Yoshida M, Ando S, Nakajima T, Ohshima H (2000) Pulsatile drug release from poly

(lactide-co-glycolide) microspheres: How does the composition of the polymer matrices affect the time interval between the initial burst and the pulsatile release of drugs? *Colloids Surf B Biointerfaces* 19, 173-179.

- [57] Panyam J, Labhasetwar V (2003) Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharm Res* 20, 212-220.
- [58] Panyam J, Labhasetwar V (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. Adv Drug Deliv Rev 55, 329-347.
- [59] Nel A, Xia T, Madler L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622-627.
- [60] Wang H, Geng QR, Wang L, Lu Y (2012) Curcumin potentiates antitumor activity of 1-asparaginase via inhibition of the AKT signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk* Lymphoma, doi:10.3109/10428194.2011.649478.
- [61] Belkacemi A, Ramassamy C (2012) Time sequence of oxidative stress in the brain from transgenic mice models of Alzheimer's disease related to the amyloid-β cascade. Free Radic Biol Med 52, 593-600.
- [62] Baldeiras I, Santana I, Proenca MT, Garrucho MH, Pascoal R, Rodrigues A, Duro D, Oliveira CR (2010) Oxidative damage and progression to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. J Alzheimers Dis 21, 1165-1177.
- [63] Lovell MA, Markesbery WR (2007) Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. J Neurosci Res 85, 3036-3040.
- [64] Ray B, Bisht S, Maitra A, Lahiri DK (2011) Neuroprotective and neurorescue effects of a novel polymeric nanoparticle formulation of curcumin (NanoCurc<sup>TM</sup>) in the neuronal cell culture and animal model: Implications for Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 23, 61-77.
- [65] Cho Y, Shi R, Ben Borgens R (2010) Chitosan nanoparticlebased neuronal membrane sealing and neuroprotection following acrolein-induced cell injury. J Biol Eng 4, 2.
- [66] Xie W, Xu P, Liu Q (2001) Antioxidant activity of watersoluble chitosan derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 11, 1699-1701.
- [67] Partha R, Conyers JL (2009) Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. Int J Nanomedicine 4, 261-275.
- [68] Anand P, Nair HB, Sung B, Kunnumakkara AB, Yadav VR, Tekmal RR, Aggarwal BB (2010) Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. Biochem Pharm 79, 330-338.
- [69] Mukerjee A, Vishwanatha JK (2009) Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. *Anticancer Res* 29, 3867.
- [70] Reddy M, Wu L, Kou W, Ghorpade A, Labhasetwar V (2008) Superoxide dismutase-loaded PLGA nanoparticles protect cultured human neurons under oxidative stress. *Appl Biochem Biotechnol* 151, 565-577.
- [71] Loo JS, Ooi CP, Boey FY (2005) Degradation of poly(lactideco-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA) by electron beam radiation. *Biomaterials* 26, 1359-1367.
- [72] Win KY, Feng SS (2005) Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 26, 2713-2722.

392

### 5.4.2 Lettre de soumission de l'article 2

-----Message d'origine-----De : postmaster@eesmail.elsevier.com [mailto:postmaster@eesmail.elsevier.com] De la part de "Nanomedicine Envoyé : 2 octobre 2013 10:41 À : Ramassamy, Charles Objet : Submission Confirmation

Dear Dr. Charles Ramassamy,

Your submission entitled "Stable curcumin-Loaded PLGA Nanoparticles suppressed Akt /Tau phosphorylation and enhanced the antiinflammatory and antioxidant activities of curcumin. Role of the polymer composition" has been received by Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <a href="http://ees.elsevier.com/nano/">http://ees.elsevier.com/nano/</a>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Sincerely,

Elsevier Editorial System Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine http://www.nanomedjournal.com/

Online Submission and Review System: http://ees.elsevier.com/nano/

### \*\*\*\*\*\*

For technical assistance with using EES, please visit the user support site at <a href="http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923">http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923</a>, where you will find contact details for 24/7 technical support. You can also search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EES via interactive tutorials.

### REFERENCES

- 1. Ramaroson, H., et al., Prévalence de la démence et de la maladie d'Alzheimer chez les personnes de 75 ans et plus: données réactualisées de la cohorte PAQUID.
- 2. Ferri, C.P., et al., Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet, 2005. 366(9503): p. 2112-7.
- 3. Terry, R.D., *Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2000. **59**(12): p. 1118-1119.
- 4. Grant, W.B., et al., *The significance of environmental factors in the etiology of Alzheimer's disease*. Journal of Alzheimer's Disease, 2002. **4**(3): p. 179-189.
- 5. Khachaturian, Z.S., *Diagnosis of Alzheimer's disease*. Arch Neurol, 1985. **42**(11): p. 1097.
- 6. Nelson, P.T., et al., Clinicopathologic correlations in a large Alzheimer disease center autopsy cohort: neuritic plaques and neurofibrillary tangles "do count" when staging disease severity. J Neuropathol Exp Neurol, 2007. 66(12): p. 1136-46.
- 7. Corder, E., et al., Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science, 1993. 261(5123): p. 921-923.
- 8. Torreilles, F. and J. Touchon, *Pathogenic theories and intrathecal analysis of the sporadic form of Alzheimer's disease*. Progress in Neurobiology, 2002. **66**(3): p. 191-203.
- 9. Puglielli, L., R.E. Tanzi, and D.M. Kovacs, *Alzheimer's disease: the cholesterol connection*. Nat Neurosci, 2003. 6(4): p. 345-351.
- 10. Lucotte, G., J.C. Turpin, and P. Landais, *Apolipoprotein E-epsilon 4 allele doses in late-onset Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 1994. **36**(4): p. 681-2.
- 11. Lucotte, G., et al., Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset sporadic Alzheimer's disease. Am J Med Genet, 1994. 54(3): p. 286-8.
- 12. Poirier, J., et al., Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. Lancet, 1993. 342(8873): p. 697-9.
- 13. Hughes, A., et al., Gastrointestinal adverse events in a general population sample of nursing home residents taking cholinesterase inhibitors. Consult Pharm, 2004. 19(8): p. 713-20.
- 14. Xu, Q., et al., Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. J Neurosci, 2006. 26(19): p. 4985-94.
- 15. Herz, J. and H.H. Bock, *Lipoprotein receptors in the nervous system*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 405-34.

- Basak, J.M., et al., Low-density lipoprotein receptor represents an apolipoprotein Eindependent pathway of Abeta uptake and degradation by astrocytes. J Biol Chem, 2012. 287(17): p. 13959-71.
- 17. LaFerla, F.M., et al., Neuronal cell death in Alzheimer's disease correlates with apoE uptake and intracellular Abeta stabilization. J Clin Invest, 1997. 100(2): p. 310-20.
- Jiang, Q., et al., ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. Neuron, 2008. 58(5): p. 681-93.
- 19. Strittmatter, W.J. and A.D. Roses, *Apolipoprotein E and Alzheimer disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(11): p. 4725-4727.
- 20. Mahley, R.W., Y. Huang, and K.H. Weisgraber, *Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport.* J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1226-9.
- 21. Poirier, J., Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, 2005. 26(3): p. 355-61.
- 22. Bertram, L., et al., Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. Nat Genet, 2007. **39**(1): p. 17-23.
- 23. Waring, S.C. and R.N. Rosenberg, Genome-wide association studies in Alzheimer disease. Arch Neurol, 2008. 65(3): p. 329-34.
- 24. Lambert, J.C., et al., Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. Nature Genetics, 2009. 41(10): p. 1094-U68.
- 25. Harold, D., et al., Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease (vol 41, pg 1088, 2009). Nature Genetics, 2013. 45(6): p. 712-712.
- 26. Beecham, G.W., et al., Genome-wide Association Study Implicates a Chromosome 12 Risk Locus for Late-Onset Alzheimer Disease. American Journal of Human Genetics, 2009. 84(1): p. 35-43.
- 27. Murrell, J., et al., A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. Science, 1991. 254(5028): p. 97-99.
- 28. Sherrington, R., Three genes for Alzheimer's disease. Nature, 1995. 375: p. 754-760.
- Rogaev, E., et al., Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. Nature, 1995.
   376(6543): p. 775-778.
- 30. Kang, J., et al., The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. 1987.
- 31. Hampel, H., et al., *The future of Alzheimer's disease: the next 10 years*. Prog Neurobiol., 2011. **95**(4): p. 718-28. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.11.008. Epub 2011 Nov 22.
- 32. Weiner Mw Fau Aisen, P.S., et al., *The Alzheimer's disease neuroimaging initiative:* progress report and future. Alzheimers Dement, 2010. **6**(3): p. 202-11.e7 LID 10.1016/j.jalz.2010.03.007 [doi].

- 33. Vallet, P.G., et al., A comparative study of histological and immunohistochemical methods for neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease. Acta Neuropathologica, 1992. 83(2): p. 170-178.
- 34. Rogers, J. and J.H. Morrison, *Quantitative morphology and regional and laminar distributions of senile plaques in Alzheimer's disease.* The Journal of neuroscience, 1985. 5(10): p. 2801-2808.
- 35. Harper, J.D. and P.T. Lansbury Jr, Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. Annu Rev Biochem, 1997. 66(1): p. 385-407.
- 36. Styren, S.D., et al., X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2000. 48(9): p. 1223-1232.
- 37. Masters, C.L., et al., Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics. J Neurochem, 2006. 97(6): p. 1700-1725.
- 38. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.* Physiological Reviews, 2001. **81**(2): p. 741-766.
- 39. Suzuki, N., et al., An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. Science, 1994. **264**(5163): p. 1336-1340.
- 40. Seubert, P., et al., Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. Nature, 1992. **359**(6393): p. 325-7.
- 41. Dickson, D.W., *The pathogenesis of senile plaques*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1997. **56**(4): p. 321-339.
- 42. Pike, C.J., B.J. Cummings, and C.W. Cotman, *Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease.* Exp Neurol, 1995. **132**(2): p. 172-179.
- 43. Itagaki, S., et al., Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. J Neuroimmunol, 1989. 24(3): p. 173-182.
- 44. Golde, T.E., et al., *Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives*. Science, 1992. **255**(5045): p. 728-730.
- Gralle, M. and S.T. Ferreira, Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. Progress in Neurobiology, 2007.
   82(1): p. 11-32.
- 46. Kamenetz, F., et al., *APP processing and synaptic function*. Neuron, 2003. **37**(6): p. 925-937.
- 47. Nishimoto, I., et al., Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTPbinding protein Go. 1993.
- 48. Sabo, S.L., et al., The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APPbinding protein, regulate cell movement. J Cell Biol, 2001. 153(7): p. 1403-1414.

- 49. Turner, A.J., L. Fisk, and N.N. Nalivaeva, *Targeting Amyloid Degrading Enzymes as Therapeutic Strategies in Neurodegeneration*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1035**(1): p. 1-20.
- 50. Nunan, J. and D.H. Small, Regulation of APP cleavage by  $\alpha$ -,  $\beta$ -and  $\gamma$ -secretases. FEBS Lett, 2000. **483**(1): p. 6-10.
- 51. Kuhn, P.-H., et al., ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive [alpha]secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. EMBO J, 2010. 29(17): p. 3020-3032.
- 52. Allinson, T.M., et al., ADAMs family members as amyloid precursor protein  $\alpha$  secretases. J Neurosci Res, 2003. 74(3): p. 342-352.
- 53. Panegyres, P.K., *The functions of the amyloid precursor protein gene*. Reviews in the Neurosciences, 2001. **12**(1): p. 1-40.
- 54. Haass, C. and D.J. Selkoe, Cellular processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid  $\beta$ -peptide. Cell, 1993. **75**(6): p. 1039-1042.
- 55. Weihofen, A., et al., *Targeting presenilin-type aspartic protease signal peptide peptidase* with y-secretase inhibitors. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(19): p. 16528-16533.
- 56. Wolfe, M.S. and R. Kopan, Intramembrane proteolysis: theme and variations. Science, 2004. 305(5687): p. 1119-1123.
- 57. De Strooper, B., Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presentiin generate an active γsecretase complex. Neuron, 2003. 38(1): p. 9-12.
- 58. Francis, R., et al., aph-1 and pen-2 Are Required for Notch Pathway Signaling,  $\gamma$ -Secretase Cleavage of  $\beta$ APP, and Presenilin Protein Accumulation. Developmental Cell, 2002. **3**(1): p. 85-97.
- 59. Edbauer, D., et al., *Reconstitution of γ-secretase activity*. Nature cell biology, 2003. **5**(5): p. 486-488.
- 60. Periz, G. and M.E. Fortini, Functional reconstitution of γ secretase through coordinated expression of presenilin, nicastrin, Aph 1, and Pen 2. J Neurosci Res, 2004. 77(3): p. 309-322.
- 61. Herreman, A., et al., *Total inactivation of &ggr;-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells*. Nature cell biology, 2000. **2**(7): p. 461-462.
- 62. Hussain, I., et al., *Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as*  $\beta$ -secretase. Molecular and Cellular Neuroscience, 1999. 14(6): p. 419-427.
- 63. Selkoe, D., et al., The Role of APP Processing and Trafficking Pathways in the Formation of Amyloid  $\beta$  Proteina. Ann N Y Acad Sci, 1996. 777(1): p. 57-64.
- 64. Guglielmotto, M., E. Tamagno, and O. Danni, Oxidative stress and hypoxia contribute to Alzheimer's disease pathogenesis: two sides of the same coin. The Scientific World Journal, 2009b. 9: p. 781-791.

- 65. Guglielmotto, M., et al., The up regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: role of oxidative stress and HIF1  $\alpha$ . J Neurochem, 2009a. **108**(4): p. 1045-1056.
- 66. Holsinger, R., et al., Increased expression of the amyloid precursor  $\beta$  secretase in Alzheimer's disease. Ann Neurol, 2002. 51(6): p. 783-786.
- 67. Seubert, P., et al., Secretion of  $\beta$ -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the  $\beta$ -amyloid peptide. Nature, 1993. **361**(6409): p. 260-263.
- 68. Jo, D.G., et al., Contribution of presentlin/gamma-secretase to calsentlin-mediated apoptosis. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(1): p. 62-6.
- 69. Tabaton, M. and E. Tamagno, *The molecular link between*  $\beta$ *-and*  $\gamma$ *-secretase activity on the amyloid*  $\beta$  *precursor protein.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2007. **64**(17): p. 2211-2218.
- 70. Tamagno, E., et al., The various aggregation states of  $\beta$ -amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. Free Radical Biology and Medicine, 2006. 41(2): p. 202-212.
- 71. Braak, F., H. Braak, and E.M. Mandelkow, A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. Acta Neuropathologica, 1994. 87(6): p. 554-567.
- 72. Goedert, M., et al., Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron, 1989. 3(4): p. 519-526.
- 73. Goedert, M., A. Klug, and R.A. Crowther, *Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 2006. **9**(3 Suppl): p. 195-207.
- 74. Avila, J., et al., Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. Physiological Reviews, 2004. **84**(2): p. 361-384.
- 75. Dou, F., et al., *Chaperones increase association of tau protein with microtubules.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(2): p. 721-726.
- 76. Johnson, G. and R. Jope, The role of microtubule associated protein 2 (MAP 2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. J Neurosci Res, 1992. 33(4): p. 505-512.
- 77. Mitchison, T. and M. Kirschner, *Cytoskeletal dynamics and nerve growth*. Neuron., 1988. 1(9): p. 761-72.
- 78. Nunez, J., Immature and mature variants of MAP2 and tau proteins and neuronal plasticity. Trends Neurosci., 1988. 11(11): p. 477-9.
- 79. Drewes, G., et al., Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. Embo J., 1992. 11(6): p. 2131-8.
- 80. Hanger, D.P., et al., Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. Neurosci Lett., 1992. 147(1): p. 58-62.

- Gong, C.X., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. Neuroscience., 1994. 61(4): p. 765-72.
- 82. Buee, L. and A. Delacourte, [Tauopathy and Alzheimer disease: a full degenerating process]. Psychol Neuropsychiatr Vieil, 2006. 4(4): p. 261-73.
- 83. Mazanetz, M.P. and P.M. Fischer, Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. Nature reviews Drug discovery, 2007. 6(6): p. 464-479.
- 84. Flament, S., et al., Abnormal tau proteins in progressive supranuclear palsy. Acta Neuropathologica, 1991. 81(6): p. 591-596.
- Ksiezak-Reding, H., et al., Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration. The American journal of pathology, 1994. 145(6): p. 1496.
- 86. Duyckaerts, C., et al., Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. Neurobiol Aging, 1997. 18(3): p. 267-273.
- 87. Dessi, F., et al., [Brain lesions, pathogenic and etiologic hypotheses of Alzheimer's disease]

Progression of Alzheimer histopathological changes. Rev Prat., 1998. 48(17): p. 1873-8.

- 88. Roth, K.A., Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2001. 60(9): p. 829-838.
- 89. Terry, R.D., et al., *Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment.* Ann Neurol, 1991. **30**(4): p. 572-580.
- 90. Bakhru, S.H., et al., Oral delivery of proteins by biodegradable nanoparticles. Adv Drug Deliv Rev, 2013. 65(6): p. 811-21.
- 91. Francis, P.T., et al., *The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999. **66**(2): p. 137-47.
- 92. BORDET, R., Maladie d'alzheimer: au-delà de la seule hypothèse cholinergique: Autres systèmes de neurotransmission et modulation des récepteurs nicotiniques. La Lettre du pharmacologue, 2003. 17(1): p. 23-31.
- 93. Satoh, K., D. Armstrong, and H. Fibiger, A comparison of the distribution of central cholinergic neurons as demonstrated by acetylcholinesterase pharmacohistochemistry and choline acetyltransferase immunohistochemistry. Brain Res Bull, 1983. 11(6): p. 693-720.
- 94. Perry, E.K., et al., Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. Br Med J, 1978. 2(6150): p. 1457-9.
- 95. Wilcock, G.K., et al., Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. J Neurol Sci, 1982. 57(2-3): p. 407-17.
- 96. Sims, N.R., et al., Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. J Neurochem, 1983. 40(2): p. 503-9.

- 97. Mishima, K., et al., The scopolamine-induced impairment of spatial cognition parallels the acetylcholine release in the ventral hippocampus in rats. Jpn J Pharmacol, 2000. **84**(2): p. 163-73.
- 98. Gutierres, J.M., et al., Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. Int J Dev Neurosci, 2014. 33: p. 88-97.
- 99. Ingram, D.K., et al., Rodent models of memory dysfunction in Alzheimer's disease and normal aging: moving beyond the cholinergic hypothesis. Life Sci, 1994. 55(25-26): p. 2037-49.
- 100. Amaral, D.G. and J. Kurz, An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. J Comp Neurol, 1985. 240(1): p. 37-59.
- Walsh, T.J., et al., Injection of IgG 192-saporin into the medial septum produces cholinergic hypofunction and dose-dependent working memory deficits. Brain Res, 1996. 726(1-2): p. 69-79.
- 102. Waite, J.J. and A.D. Chen, *Differential changes in rat cholinergic parameters subsequent* to immunotoxic lesion of the basal forebrain nuclei. Brain Res, 2001. **918**(1-2): p. 113-20.
- 103. Fontana, D.J., G.T. Inouye, and R.M. Johnson, *Linopirdine (DuP 996) improves* performance in several tests of learning and memory by modulation of cholinergic neurotransmission. Pharmacol Biochem Behav, 1994. **49**(4): p. 1075-82.
- 104. Kar, S., et al., Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. J Neurochem, 1998. 70(5): p. 2179-87.
- 105. Auld, D.S., S. Kar, and R. Quirion,  $\beta$ -Amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link? Trends Neurosci, 1998. **21**(1): p. 43-49.
- 106. Lovestone S Fau Reynolds, C.H., et al., *Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein*. Curr Biol, 1994. 4(12): p. 1077-86.
- 107. Sadot, E., et al., Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptor regulates  $\tau$  phosphorylation in transfected PC12 cells. J Neurochem, 1996. **66**(2): p. 877-880.
- 108. Hardy, J., Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. J Alzheimers Dis, 2006. 9(3 Suppl): p. 151-3.
- 109. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.* Science, 2002. **297**(5580): p. 353-6.
- 110. Hardy Ja Fau Higgins, G.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis.* Science, 1992. **256**(5054): p. 184-5.
- 111. Bignante, E.A., et al., Amyloid  $\beta$  precursor protein as a molecular target for amyloid  $\beta$ induced neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, 2013.
- 112. Laganowsky, A., et al., Atomic view of a toxic amyloid small oligomer. Science, 2012. 335(6073): p. 1228-1231.

- 113. O'Nuallain, B., et al., Amyloid  $\beta$ -protein dimers rapidly form stable synaptotoxic protofibrils. The Journal of neuroscience, 2010. **30**(43): p. 14411-14419.
- 114. Nunomura, A., et al., Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2001. 60(8): p. 759-767.
- 115. Pratico, D., et al., Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. J Neurosci, 2001. **21**(12): p. 4183-7.
- 116. Drake, J., C.D. Link, and D.A. Butterfield, Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic Caenorhabditis elegans model. Neurobiol Aging, 2003. 24(3): p. 415-20.
- 117. Li, F., et al., Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice. J Neurochem, 2004. 89(5): p. 1308-12.
- 118. Bishop, G.M. and S.R. Robinson, *Human Abeta1-42 reduces iron-induced toxicity in rat cerebral cortex.* J Neurosci Res, 2003. **73**(3): p. 316-23.
- 119. Belkacemi, A. and C. Ramassamy, *Time sequence of oxidative stress in the brain from* transgenic mouse models of Alzheimer's disease related to the amyloid- $\beta$  cascade. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **52**(3): p. 593-600.
- 120. Markesbery, W.R., Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. Free Radical Biology and Medicine, 1997. 23(1): p. 134-147.
- 121. Singh, M., et al., Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. Journal of Alzheimer's Disease, 2010. **21**(3): p. 741-756.
- 122. Butterfield, D., et al., Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. J Nutr Biochem, 2002. 13(8): p. 444.
- 123. Smith, M.A., et al., Oxidative damage in Alzheimer's. Nature, 1996. 382(6587): p. 120-1.
- 124. Christen, Y., Oxidative stress and Alzheimer disease. Am J Clin Nutr, 2000. 71(2): p. 621S-629S.
- 125. Tabner, B.J., et al., Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(43): p. 35789-35792.
- 126. Caldeira, G.L., I.L. Ferreira, and A.C. Rego, Impaired transcription in Alzheimer's disease: key role in mitochondrial dysfunction and oxidative stress. Journal of Alzheimer's Disease, 2013. 34(1): p. 115-131.
- 127. Haleng, J., et al., [Oxidative stress]. Rev Med Liege, 2007. 62(10): p. 628-38.
- 128. Favier, A., Le stress oxydant. L'actualité chimique, 2003: p. 108.
- Gupta, A., et al., Age-related elevation of lipid peroxidation products: diminution of superoxide dismutase activity in the central nervous system of rats. Gerontology, 1991. 37(6): p. 305-9.
- 130. Valko, M., *Antioxidant Activity*. Food Oxidants and Antioxidants: Chemical, Biological, and Functional Properties, 2013. **18**: p. 325.

- 131. Zelko, I.N., T.J. Mariani, and R.J. Folz, Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic Biol Med, 2002. 33(3): p. 337-49.
- 132. MatÉs, J.M., C. Pérez-Gómez, and I.N. De Castro, Antioxidant enzymes and human diseases. Clinical biochemistry, 1999. 32(8): p. 595-603.
- 133. Currais, A. and P. Maher, *Functional consequences of age-dependent changes in glutathione status in the brain.* Antioxidants & redox signaling, 2013.
- 134. Gutteridge, J.M. and B. Halliwell, *Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence.* Free Radic Res, 1993. **19**(3): p. 141-158.
- 135. Chauhan, V. and A. Chauhan, Oxidative stress in Alzheimer's disease. Pathophysiology, 2006. 13(3): p. 195-208.
- 136. Cini, M. and A. Moretti, *Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain.* Neurobiol Aging, 1995. **16**(1): p. 53-57.
- 137. Zhu, P., et al., Characterization of a lipid hydroperoxide-derived RNA adduct in rat intestinal epithelial cells. Chemical research in toxicology, 2006. **19**(6): p. 809-817.
- 138. Hamilton, M.L., et al., *Does oxidative damage to DNA increase with age?* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(18): p. 10469-10474.
- 139. Berlett, B.S. and E.R. Stadtman, *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress.* J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20313-6.
- 140. Santos, R.X., et al., *Mitochondrial DNA Oxidative Damage and Repair in Aging and Alzheimer's Disease*. Antioxidants & redox signaling, 2013. **18**(18): p. 2444-2457.
- 141. Lagouge, M. and N.G. Larsson, *The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing*. Journal of internal medicine, 2013.
- 142. Stadtman, E.R., et al., Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. Mol Cell Biochem, 2002. 234-235(1-2): p. 3-9.
- 143. Stadtman, E.R., et al., Implication of protein oxidation in protein turnover, aging, and oxygen toxicity. Basic Life Sci, 1988. 49: p. 331-9.
- 144. Stadtman, E.R. and R.L. Levine, Protein oxidation. Ann N Y Acad Sci, 2000. 899: p. 191-208.
- 145. Forster, M.J., et al., Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. 93(10): p. 4765-4769.
- 146. Poon, H.F., et al., Quantitative proteomics analysis of differential protein expression and oxidative modification of specific proteins in the brains of old mice. Neurobiol Aging, 2006. 27(7): p. 1010-9.
- 147. Singh, M., et al., Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. J Alzheimers Dis, 2010. 21(3): p. 741-56.

- 148. Morrow, J.D., et al., A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(23): p. 9383-7.
- 149. Roberts, L.J., 2nd, et al., Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. J Biol Chem, 1998. 273(22): p. 13605-12.
- Lawson, J.A., J. Rokach, and G.A. FitzGerald, *Isoprostanes: formation, analysis and use* as indices of lipid peroxidation in vivo. Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(35): p. 24441-24444.
- 151. Milne, G.L., et al., *The cyclopentenone product of lipid peroxidation, 15-A2t-isoprostane, is efficiently metabolized by HepG2 cells via conjugation with glutathione.* Chemical research in toxicology, 2004. **17**(1): p. 17-25.
- Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, Chemistry and biochemistry of 4hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med, 1991. 11(1): p. 81-128.
- 153. Marnett, L.J., J.N. Riggins, and J.D. West, *Endogenous generation of reactive oxidants* and electrophiles and their reactions with DNA and protein. Journal of Clinical Investigation, 2003. **111**(5): p. 583-593.
- 154. Kehrer, J.P. and S.S. Biswal, *The molecular effects of acrolein*. Toxicol Sci, 2000. 57(1): p. 6-15.
- 155. Luo, J. and R. Shi, Acrolein induces oxidative stress in brain mitochondria. Neurochem Int, 2005. 46(3): p. 243-252.
- 156. Luo, J., J.P. Robinson, and R. Shi, Acrolein-induced cell death in PC12 cells: Role of mitochondria-mediated oxidative stress. Neurochem Int, 2005. 47(7): p. 449-457.
- 157. Dang, T.N., et al., Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. Current molecular pharmacology, 2010. 3(2): p. 66.
- 158. Hensley, K., et al., A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(8): p. 3270-4.
- Behl, C., et al., Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. Cell, 1994. 77(6):
   p. 817-827.
- 160. Feaga, H.A., et al., Affinity of Cu+ for the copper-binding domain of the amyloid-beta peptide of Alzheimer's disease. Inorg Chem, 2011. 50(5): p. 1614-8.
- 161. Zou, K., et al., A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. J Neurosci., 2002. 22(12): p. 4833-41.
- 162. Streltsov, V.A., et al., The Structure of the Amyloid-< i>β</i> Peptide High-Affinity Copper II Binding Site in Alzheimer Disease. Biophysical journal, 2008. 95(7): p. 3447-3456.

- 163. Misonou, H., M. Morishima-Kawashima, and Y. Ihara, Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) in human neuroblastoma cells. Biochemistry, 2000. **39**(23): p. 6951-6959.
- 164. Butterfield, D.A., et al., Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid  $\beta$ -peptide. Trends in molecular medicine, 2001. 7(12): p. 548-554.
- 165. Xie, Z., et al., Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -peptide1-42-and lipopolysaccharide-activated microglia. The Journal of neuroscience, 2002. **22**(9): p. 3484-3492.
- Bozner, P., et al., *The Amyloid [beta] Protein Induces Oxidative Damage of Mitochondrial DNA*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1997. 56(12): p. 1356-1362.
- 167. Boyd-Kimball, D., et al., Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid  $\beta$ -peptide (1-42) into rat brain: Implications for Alzheimer's disease. Neuroscience, 2005. **132**(2): p. 313-324.
- Behl, C., et al., Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. Cell, 1994. 77(6):
  p. 817-827.
- 169. Yao, Y., et al., Brain inflammation and oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer-like brain amyloidosis. J Neuroinflammation, 2004. 1(1): p. 21.
- 170. Paola, D., et al., Oxidative Stress Induces Increase in Intracellular Amyloid  $\beta$ -Protein Production and Selective Activation of  $\beta I$  and  $\beta II$  PKCs in NT2 Cells. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **268**(2): p. 642-646.
- 171. Pei, J.J., et al., Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(9): p. 1010-9.
- 172. Iqbal, K., et al., Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration: pivotal and multifactorial. Biochem Soc Trans., 2010. **38**(4): p. 962-6. doi: 10.1042/BST0380962.
- 173. Gong, C.X., et al., *Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain.* J Neurochem, 1995. **65**(2): p. 732-8.
- 174. Lovell, M.A., et al., Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3. J Alzheimers Dis, 2004. 6(6): p. 659-71; discussion 673-81.
- 175. Gomez-Ramos, A., et al., *Effect of the lipid peroxidation product acrolein on tau phosphorylation in neural cells.* J Neurosci Res, 2003. 71(6): p. 863-70.
- 176. Su, B., et al., Chronic oxidative stress causes increased tau phosphorylation in M17 neuroblastoma cells. Neurosci Lett, 2010. 468(3): p. 267-71.
- 177. Dias-Santagata, D., et al., Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in Drosophila. J Clin Invest, 2007. 117(1): p. 236-45.
- 178. Melov, S., et al., Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. PLoS One, 2007. 2(6): p. e536.

- 179. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature, 2006. 443(7113): p. 787-795.
- 180. Nourooz-Zadeh J Fau Liu, E.H., et al., F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in. J Neurochem, 1999. 72(2): p. 734-40.
- 181. Montine, T.J., et al., Cerebrospinal fluid F2-isoprostane levels are increased in Alzheimer's disease. Ann Neurol, 1998. 44(3): p. 410-3.
- 182. Markesbery, W. and M. Lovell, Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, 1998. 19(1): p. 33-36.
- 183. Lovell, M.A. and W.R. Markesbery, Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. J Neurosci Res, 2007. **85**(14): p. 3036-3040.
- 184. Wang, J., W.R. Markesbery, and M.A. Lovell, *Increased oxidative damage in nuclear* and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. J Neurochem, 2006. **96**(3): p. 825-32.
- 185. Keller, J., et al., Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. Neurology, 2005. 64(7): p. 1152-1156.
- 186. Butterfield, D.A., et al., *Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease.* Neurobiol Dis, 2006. **22**(2): p. 223-232.
- 187. Aksenov, M., et al., Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. Neuroscience, 2001. 103(2): p. 373-383.
- 188. Aluise, C.D., et al., Redox proteomics analysis of brains from subjects with amnestic mild cognitive impairment compared to brains from subjects with preclinical Alzheimer's disease: insights into memory loss in MCI. Journal of Alzheimer's Disease, 2011. 23(2): p. 257-269.
- 189. Sultana, R., M. Perluigi, and D.A. Butterfield, *Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics.* Antioxidants & redox signaling, 2006. **8**(11-12): p. 2021-2037.
- Dang, T.N., M. Arseneault, and C. Ramassamy, Regulation of redox-sensitive signaling pathways in rat primary astrocytes following acrolein exposure. J Alzheimers Dis, 2011.
   25(2): p. 263-77.
- 191. Praticò, D., et al., Increased 8, 12 iso iPF2α VI in Alzheimer's disease: Correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. Ann Neurol, 2000. 48(5): p. 809-812.
- 192. Pratico, D., et al., Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. Arch Neurol, 2002. **59**(6): p. 972-6.
- 193. Migliore, L., et al., Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. Neurobiol Aging, 2005. 26(5): p. 587-595.
- 194. Markesbery, W.R., et al., Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnestic mild cognitive impairment. Ann Neurol, 2005. 58(5): p. 730-735.

- 195. Williams, T.I., et al., Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, 2006. 27(8): p. 1094-1099.
- 196. Bradley, M., W. Markesbery, and M. Lovell, *Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein in the brain in preclinical Alzheimer's disease (PCAD)*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(12): p. 1570.
- 197. Ding, Q., et al., Ribosome dysfunction is an early event in Alzheimer's disease. J Neurosci, 2005. 25(40): p. 9171-5.
- 198. Keller, J.N., et al., Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. Neurology, 2005. 64(7): p. 1152-6.
- 199. Huang, Y.J., et al., Acrolein induces Alzheimer's disease-like pathologies in vitro and in vivo. Toxicol Lett, 2013. 217(3): p. 184-91.
- 200. Sakata, T., et al., Rat urinary bladder epithelial lesions induced by acrolein. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 1989. 9(2): p. 159-69.
- 201. Conklin, D.J., et al., Acrolein consumption induces systemic dyslipidemia and lipoprotein modification. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. 243(1): p. 1-12.
- 202. Ismahil, M.A., et al., *Chronic oral exposure to the aldehyde pollutant acrolein induces dilated cardiomyopathy.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(5): p. H2050-60.
- 203. Srivastava, S., et al., Oral exposure to acrolein exacerbates atherosclerosis in apoE-null mice. Atherosclerosis, 2011. 215(2): p. 301-8.
- 204. Pratico D Fau Uryu, K., et al., Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model. J Neurosci, 2001. 21(12): p. 4183-7.
- 205. Schuessel, K., et al., Impaired Cu/Zn-SOD activity contributes to increased oxidative damage in APP transgenic mice. Neurobiol Dis, 2005. 18(1): p. 89-99.
- 206. Resende, R., et al., Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. Free Radic Biol Med, 2008. 44(12): p. 2051-7.
- 207. Sonnen, J.A., et al., Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models. Free Radic Biol Med, 2008. 45(3): p. 219-30.
- 208. Hsiao, K., et al., Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science, 1996. 274(5284): p. 99-102.
- 209. Cimini, A., et al., Early biochemical and morphological modifications in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for peroxisomes. J Alzheimers Dis, 2009. 18(4): p. 935-52.
- 210. Duff, K., et al., Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. Nature, 1996. 383(6602): p. 710-3.
- 211. Schuessel, K., et al., Aging sensitizes toward ROS formation and lipid peroxidation in *PS1M146L transgenic mice*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(5): p. 850-62.
- 212. Flood, D.G., et al., FAD mutant PS-1 gene-targeted mice: increased A beta 42 and A beta deposition without APP overproduction. Neurobiol Aging., 2002. 23(3): p. 335-48.

- Abdul, H.M., et al., Oxidative damage in brain from human mutant APP/PS-1 double knock-in mice as a function of age. Free Radic Biol Med., 2008. 45(10): p. 1420-5. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.012. Epub 2008 Aug 16.
- 214. Anantharaman, M., et al., Beta-amyloid mediated nitration of manganese superoxide dismutase: implication for oxidative stress in a APPNLH/NLH X PS-1P264L/P264L double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. Am J Pathol, 2006. 168(5): p. 1608-18.
- 215. Huang, Q., et al., Potential in vivo amelioration by N-acetyl-L-cysteine of oxidative stress in brain in human double mutant APP/PS-1 knock-in mice: toward therapeutic modulation of mild cognitive impairment. J Neurosci Res, 2010. 88(12): p. 2618-29.
- 216. Oddo, S., et al., Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. Neuron, 2003. **39**(3): p. 409-21.
- 217. Billings, L.M., et al., Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's diseaserelated cognitive deficits in transgenic mice. Neuron, 2005. 45(5): p. 675-88.
- 218. Chou, J.L., et al., Early dysregulation of the mitochondrial proteome in a mouse model of Alzheimer's disease. J Proteomics, 2011. 74(4): p. 466-79.
- 219. Ramsey Cp Fau Glass, C.A., et al., *Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases*. J Neuropathol Exp Neurol, 2007. **66**(1): p. 75-85.
- 220. Mattson, M. and M. Meffert, Roles for NF-κB in nerve cell survival, plasticity, and disease. Cell Death & Differentiation, 2006. 13(5): p. 852-860.
- 221. Kaltschmidt, B., P.A. Baeuerle, and C. Kaltschmidt, Potential involvement of the transcription factor NF-κB in neurological disorders. Molecular Aspects of Medicine, 1993. 14(3): p. 171-190.
- 222. Hooper, C., R. Killick, and S. Lovestone, *The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2008. **104**(6): p. 1433-1439.
- 223. Bonda, D.J., et al., *The sirtuin pathway in ageing and Alzheimer disease: mechanistic and therapeutic considerations.* The Lancet Neurology, 2011. **10**(3): p. 275-279.
- 224. Joshi G Fau Johnson, J.A. and J.A. Johnson, *The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of.* Recent Pat CNS Drug Discov, 2012. 7(3): p. 218-29.
- 225. Scapagnini, G., et al., Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. Molecular neurobiology, 2011. 44(2): p. 192-201.
- 226. Sun, Z., et al., *Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(18): p. 6334-49.
- 227. Yamamoto, T., et al., *Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(8): p. 2758-70.
- 228. Kanninen, K., et al., Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid. Mol Cell Neurosci, 2008. 39(3): p. 302-13.

- 229. Kanninen, K., et al., Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing Nrf2 improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(38): p. 16505-10.
- 230. Doggui, S., et al., Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways. Mol Nutr Food Res, 2013.
- 231. Elliott, P.J. and M. Jirousek, *Sirtuins: novel targets for metabolic disease*. Curr Opin Investig Drugs, 2008. 9(4): p. 371-8.
- 232. Brunet, A., et al., Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRTI deacetylase. Science, 2004. 303(5666): p. 2011-5.
- 233. Yeung, F., et al., Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. EMBO J, 2004. 23(12): p. 2369-80.
- 234. Langley, E., et al., Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. EMBO J, 2002. 21(10): p. 2383-96.
- 235. Wang, J., et al., The role of Sirt1: at the crossroad between promotion of longevity and protection against Alzheimer's disease neuropathology. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics, 2010. **1804**(8): p. 1690-1694.
- 236. Michán, S., et al., SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. The Journal of neuroscience, 2010. **30**(29): p. 9695-9707.
- 237. Albani, D., et al., *The SIRT1 activator resveratrol protects SK-N-BE cells from oxidative stress and against toxicity caused by alpha-synuclein or amyloid-beta (1-42) peptide.* J Neurochem, 2009. **110**(5): p. 1445-56.
- Feige, J.N., et al., Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. Cell Metab, 2008.
   8(5): p. 347-58.
- 239. Chen, J., et al., SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. J Biol Chem, 2005. 280(48): p. 40364-74.
- 240. Donmez, G., et al., SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alphasecretase gene ADAM10. Cell, 2010. 142(2): p. 320-32.
- 241. Tippmann, F., et al., Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. FASEB J, 2009. 23(6): p. 1643-54.
- 242. Costa, R.M., C. Drew, and A.J. Silva, Notch to remember. Trends Neurosci, 2005. 28(8): p. 429-35.
- 243. Xiao, M.J., et al., Notch signaling and neurogenesis in normal and stroke brain. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2009. 1(2): p. 192-202.
- 244. Min, S.W., et al., Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. Neuron, 2010. 67(6): p. 953-66.
- 245. Karagiannis, T.C. and K. Ververis, *Potential of chromatin modifying compounds for the treatment of Alzheimer's disease*. Pathobiol Aging Age Relat Dis, 2012. 2.
- 246. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, NF-kappa B: ten years after. Cell, 1996. 87(1): p. 13-20.
- 247. Kaltschmidt, C., et al., *Constitutive NF-kappa B activity in neurons*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(6): p. 3981-92.
- 248. Guerrini, L., F. Blasi, and S. Denis-Donini, Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(20): p. 9077-81.
- 249. Simpson, C.S. and B.J. Morris, Activation of nuclear factor kappaB by nitric oxide in rat striatal neurones: differential inhibition of the p50 and p65 subunits by dexamethasone. J Neurochem, 1999. 73(1): p. 353-61.
- 250. Yu, Z., et al., Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kappaB increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. J Neurosci, 1999. 19(20): p. 8856-65.
- 251. May, M.J. and S. Ghosh, *IkappaB kinases: kinsmen with different crafts.* Science, 1999. **284**(5412): p. 271-3.
- 252. Terai, K., A. Matsuo, and P.L. McGeer, Enhancement of immunoreactivity for NF-κB in the hippocampal formation and cerebral cortex of Alzheimer's disease. Brain Res, 1996. 735(1): p. 159-168.
- 253. Mattson, M.P. and M.K. Meffert, *Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease.* Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 852-60.
- 254. Li, N. and M. KARIN, *Is NF-κB the sensor of oxidative stress?* The FASEB Journal, 1999. **13**(10): p. 1137-1143.
- 255. Mattson, M.P., et al., Activation of  $NF \kappa B$  protects hippocampal neurons against oxidative stress - induced apoptosis: Evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. J Neurosci Res, 1997. **49**(6): p. 681-697.
- 256. Boissiere, F., et al., Nuclear translocation of NF-kappaB in cholinergic neurons of patients with Alzheimer's disease. Neuroreport, 1997. 8(13): p. 2849-52.
- 257. Ho, G.J., et al., *Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(2): p. 247-56.
- 258. Sung S Fau Yang, H., et al., Modulation of nuclear factor-kappa B activity by indomethacin influences A beta. Am J Pathol, 2004. 165(6): p. 2197-206.
- 259. Barger, S.W., et al., Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca2+ accumulation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. 92(20): p. 9328-9332.
- Lei, P., et al., GSK-3 in Neurodegenerative Diseases. Int J Alzheimers Dis, 2011. 2011: p. 189246.
- 261. Woodgett, J.R., Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. EMBO J, 1990. 9(8): p. 2431-8.

- 262. Yao, H.-B., et al., *Expression of glycogen synthase kinase-3 isoforms in mouse tissues and their transcription in the brain*. Journal of chemical neuroanatomy, 2002. 23(4): p. 291-297.
- 263. Dajani R Fau Fraser, E., et al., Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for. Cell, 2001. 105(6): p. 721-32.
- 264. Soutar Mp Fau Kim, W.-Y., et al., Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate. J Neurochem, 2010. 115(4): p. 974-83 LID - 10.1111/j.1471-4159.2010.06988.x [doi].
- 265. Hoeflich Kp Fau Luo, J., et al., *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB*. Nature, 2000. **406**(6791): p. 86-90.
- 266. MacAulay, K., et al., Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. Cell Metab, 2007. 6(4): p. 329-37.
- 267. Uranga, R.M., N.M. Giusto, and G.A. Salvador, Iron-induced oxidative injury differentially regulates PI3K/Akt/GSK3beta pathway in synaptic endings from adult and aged rats. Toxicol Sci, 2009. 111(2): p. 331-44.
- Uranga, R.M., S. Katz, and G.A. Salvador, Enhanced phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling has pleiotropic targets in hippocampal neurons exposed to ironinduced oxidative stress. J Biol Chem, 2013. 288(27): p. 19773-84.
- 269. Lee, K.Y., et al., *Phosphatidylinositol-3-kinase activation blocks amyloid beta-induced neurotoxicity*. Toxicology, 2008. **243**(1-2): p. 43-50.
- 270. Koh, S.H., M.Y. Noh, and S.H. Kim, *Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3*. Brain Res, 2008. **1188**: p. 254-62.
- 271. Hanger Dp Fau Hughes, K., et al., *Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of.* Neurosci Lett, 1992. **147**(1): p. 58-62.
- 272. Cho, J.H. and G.V. Johnson, *Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding.* J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 187-93.
- 273. Brownlees J Fau Irving, N.G., et al., *Tau phosphorylation in transgenic mice expressing glycogen synthase kinase-3beta*. Neuroreport, 1997. **8**(15): p. 3251-5.
- 274. Engel T Fau Goni-Oliver, P., et al., *Hippocampal neuronal subpopulations are differentially affected in double*. Neuroscience, 2008. 157(4): p. 772-80 LID 10.1016/j.neuroscience.2008.09.047 [doi].
- 275. Engel T Fau Goni-Oliver, P., et al., Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice. J Neurochem, 2006. 99(6): p. 1445-55.
- 276. Malm Tm Fau livonen, H., et al., *Pyrrolidine dithiocarbamate activates Akt and improves spatial learning in.* J Neurosci, 2007. 27(14): p. 3712-21.
- 277. Terwel D Fau Muyllaert, D., et al., Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. Am J Pathol, 2008. 172(3): p. 786-98 LID 10.2353/ajpath.2008.070904 [doi].

- 278. Takashima A Fau Honda, T., et al., Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta. Neurosci Res, 1998. 31(4): p. 317-23.
- 279. Phiel Cj Fau Wilson, C.A., et al., GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. Nature, 2003. 423(6938): p. 435-9.
- 280. Higgins, J.P. and L. Flicker, *Lecithin for dementia and cognitive impairment*. Cochrane Database Syst Rev, 2003(3): p. CD001015.
- 281. Adibhatla, R.M. and J.F. Hatcher, *Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) in stroke* and other CNS disorders. Neurochem Res, 2005. **30**(1): p. 15-23.
- 282. Amenta, F., et al., Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors. Ineffective treatments or inappropriate approaches? Mech Ageing Dev, 2001. **122**(16): p. 2025-40.
- Parnetti, L., F. Amenta, and V. Gallai, Choline alphoscerate in cognitive decline and in acute cerebrovascular disease: an analysis of published clinical data. Mech Ageing Dev, 2001. 122(16): p. 2041-55.
- 284. Nordberg, A. and A.L. Svensson, Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology. Drug Saf, 1998. 19(6): p. 465-80.
- 285. Alva, G. and J.L. Cummings, *Relative tolerability of Alzheimer's disease treatments*. Psychiatry (Edgmont), 2008. **5**(11): p. 27-36.
- 286. Seitz, D.P., et al., Cholinesterase inhibitor use in U.S. nursing homes: results from the national nursing home survey. J Am Geriatr Soc, 2009. 57(12): p. 2269-74.
- 287. Parsons, C.G., W. Danysz, and G. Quack, *Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update.* Drug News Perspect, 1998. **11**(9): p. 523-69.
- 288. Nishizaki, T., et al., The anti-dementia drug nefiracetam facilitates hippocampal synaptic transmission by functionally targeting presynaptic nicotinic ACh receptors. Brain Res Mol Brain Res, 2000. 80(1): p. 53-62.
- 289. Danysz, W., et al., Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. Neurotox Res, 2000. 2(2-3): p. 85-97.
- 290. Fleischhacker, W.W., A. Buchgeher, and H. Schubert, *Memantine in the treatment of senile dementia of the Alzheimer type*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 1986. **10**(1): p. 87-93.
- 291. Robinson, D.M. and G.M. Keating, Memantine. Drugs, 2006. 66(11): p. 1515-1534.
- 292. Cosman, K.M., L.L. Boyle, and A.P. Porsteinsson, Memantine in the treatment of mildto-moderate Alzheimer's disease. 2007.
- 293. Evin, G., M.F. Sernee, and C.L. Masters, *Inhibition of γ-Secretase as a Therapeutic Intervention for Alzheimer's Disease.* CNS drugs, 2006. **20**(5): p. 351-372.
- 294. Tschape, J.-A. and T. Hartmann, *Therapeutic perspectives in Alzheimers disease*. Recent patents on CNS drug discovery, 2006. **1**(1): p. 119-127.

- 295. Ring, S., et al., The secreted  $\beta$ -amyloid precursor protein ectodomain APPsa is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. The Journal of neuroscience, 2007. 27(29): p. 7817-7826.
- 296. Hartmann, D., et al., *The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for α-secretase activity in fibroblasts.* Human molecular genetics, 2002. **11**(21): p. 2615-2624.
- 297. Luo, Y., et al., Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's  $\beta$ -secretase, have normal phenotype and abolished  $\beta$ -amyloid generation. Nat Neurosci, 2001. 4(3): p. 231-232.
- 298. Wolfe, M.S., *The secretases of Alzheimer's disease*. Current topics in developmental biology, 2003. **54**: p. 233-261.
- 299. Hamaguchi, T., K. Ono, and M. Yamada, Anti-amyloidogenic therapies: strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2006. 63(13): p. 1538-1552.
- 300. Hong, L., et al., Structure of the protease domain of memapsin 2 (β-secretase) complexed with inhibitor. Science, 2000. **290**(5489): p. 150-153.
- 301. Laird, F.M., et al., BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. The Journal of neuroscience, 2005. 25(50): p. 11693-11709.
- 302. Willem, M., et al., Control of peripheral nerve myelination by the  $\beta$ -secretase BACE1. Science, 2006. **314**(5799): p. 664-666.
- 303. Hu, X., et al., *Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system.* Nat Neurosci, 2006. 9(12): p. 1520-1525.
- 304. Guardia-Laguarta, C., M. Pera, and A. Lleo, gamma-Secretase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. Current drug targets, 2010. 11(4): p. 506-517.
- 305. Nyborg, A.C., et al., Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. Mol Neurodegener, 2006. 1(3).
- Akiyama, H., et al., Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, 2000.
  21(3): p. 383-421.
- 307. Stewart, W.F., et al., *Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use*. Neurology, 1997. **48**(3): p. 626-632.
- 308. Weggen, S., et al., A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. Nature, 2001. 414(6860): p. 212-6.
- 309. Eriksen, J.L., et al., NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target  $\gamma$ -secretase and lower  $A\beta 42$  in vivo. Journal of Clinical Investigation, 2003. **112**(3): p. 440-449.
- 310. Aisen, P.S., The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. Lancet Neurol, 2002. 1(5): p. 279-84.
- 311. Van Gool, W.A., et al., Effect of hydroxychloroquine on progression of dementia in early Alzheimer's disease: an 18-month randomised, double-blind, placebo-controlled study. Lancet, 2001. 358(9280): p. 455-60.

- 312. Portelius, E., et al., A novel Abeta isoform pattern in CSF reflects gamma-secretase inhibition in Alzheimer disease. Alzheimers Res Ther, 2010. 2(2): p. 7.
- 313. Bhala, N., et al., Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal antiinflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. Lancet, 2013. **382**(9894): p. 769-79.
- 314. Mangialasche, F., et al., Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. Lancet Neurol, 2010. 9(7): p. 702-16.
- 315. Winblad, B., et al., Safety, tolerability, and antibody response of active Abeta immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. Lancet Neurol, 2012. 11(7): p. 597-604.
- 316. Schneeberger, A., et al., Development of AFFITOPE vaccines for Alzheimer's disease (AD)--from concept to clinical testing. J Nutr Health Aging, 2009. 13(3): p. 264-7.
- 317. Salloway, S., et al., A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. Neurology, 2009. 73(24): p. 2061-70.
- 318. Fox, N.C., et al., *Effects of Abeta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease.* Neurology, 2005. **64**(9): p. 1563-72.
- 319. Gilman, S., et al., Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. Neurology, 2005. 64(9): p. 1553-62.
- 320. Masliah, E., et al., Abeta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. Neurology, 2005. 64(1): p. 129-31.
- 321. Nicoll, J.A., et al., Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. Nat Med, 2003. 9(4): p. 448-52.
- 322. Nicoll, J.A., et al., *Abeta species removal after abeta42 immunization*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(11): p. 1040-8.
- 323. Wisniewski, T. and F. Goni, *Immunotherapy for Alzheimer's disease*. Biochem Pharmacol, 2014. 88(4): p. 499-507.
- 324. Ramassamy, C., Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. European Journal of Pharmacology, 2006. 545(1): p. 51-64.
- 325. Singh, M., et al., Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. J Agric Food Chem, 2008. 56(13): p. 4855-73.
- 326. Scalbert, A. and G. Williamson, *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. J Nutr, 2000. **130**(8S Suppl): p. 2073S-85S.
- 327. Nemeth, K., et al., Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. Eur J Nutr, 2003. 42(1): p. 29-42.
- 328. Frankel, E.N., A.L. Waterhouse, and J.E. Kinsella, *Inhibition of human LDL oxidation by* resveratrol. Lancet, 1993. **341**(8852): p. 1103-4.

- 329. Sofi, F., et al., Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score. Public Health Nutr, 2013: p. 1-14.
- 330. Lemeshow, S., et al., Illustration of analysis taking into account complex survey considerations: the association between wine consumption and dementia in the PAQUID study. Personnes Ages Quid. Am J Epidemiol, 1998. **148**(3): p. 298-306.
- 331. Commenges, D., et al., Intake of flavonoids and risk of dementia. European journal of epidemiology, 2000. 16(4): p. 357-363.
- 332. Scarmeas, N., et al., *Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 2006. **59**(6): p. 912-921.
- 333. Zandi, P.P., et al., Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. Arch Neurol, 2004. 61(1): p. 82-8.
- 334. Engelhart, M.J., et al., *Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease*. JAMA, 2002. **287**(24): p. 3223-9.
- 335. Masaki, K.H., et al., Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men. Neurology, 2000. 54(6): p. 1265-1272.
- 336. Morris, M.C., et al., Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. JAMA, 2002. 287(24): p. 3230-7.
- 337. Commenges, D., et al., *Intake of flavonoids and risk of dementia*. Eur J Epidemiol, 2000. **16**(4): p. 357-63.
- 338. Kalmijn, S., et al., *Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men.* American Journal of Epidemiology, 1997. **145**(1): p. 33-41.
- 339. Ames, B.N., M.K. Shigenaga, and T.M. Hagen, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. 90(17): p. 7915-7922.
- 340. Cicerale, S., L. Lucas, and R. Keast, *Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil.* Int J Mol Sci, 2010. **11**(2): p. 458-79.
- 341. Visioli, F., G. Bellomo, and C. Galli, *Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(1): p. 60-4.
- 342. Ahlemeyer, B. and J. Krieglstein, *Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(9): p. 1779-92.
- 343. Marcocci, L., et al., *The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb* 761. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **201**(2): p. 748-55.
- 344. Bastianetto, S., et al., The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. Eur J Neurosci, 2000. 12(6): p. 1882-90.
- 345. Islam, M.A., Cardiovascular effects of green tea catechins: progress and promise. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov, 2012. 7(2): p. 88-99.
- 346. Li, Q. and Y. Li, [Review on the neuroprotective effects of green tea polyphenols for the treatment of neurodegenerative diseases]. Wei Sheng Yan Jiu, 2010. **39**(1): p. 123-6.

- 347. Graham, H.N., Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. Prev Med, 1992. 21(3): p. 334-50.
- 348. Moyers, S.B. and N.B. Kumar, Green tea polyphenols and cancer chemoprevention: multiple mechanisms and endpoints for phase II trials. Nutr Rev, 2004. 62(5): p. 204-11.
- 349. Guo, Q., et al., Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. Biochim Biophys Acta, 1996. 1304(3): p. 210-22.
- 350. Sellappan, S., C.C. Akoh, and G. Krewer, *Phenolic compounds and antioxidant capacity* of Georgia-grown blueberries and blackberries. J Agric Food Chem, 2002. **50**(8): p. 2432-8.
- 351. Mazza, G., et al., Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. J Agric Food Chem, 2002. 50(26): p. 7731-7.
- 352. Stivala, L.A., et al., Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. J Biol Chem, 2001. 276(25): p. 22586-94.
- 353. de la Lastra, C.A. and I. Villegas, *Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications.* Molecular Nutrition & Food Research, 2005. **49**(5): p. 405-430.
- 354. Jang, M.S., et al., Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science, 1997. 275(5297): p. 218-220.
- 355. Richard, T., et al., *Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1215**: p. 103-8.
- 356. Rezai-Zadeh, K., et al., Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. The Journal of neuroscience, 2005. 25(38): p. 8807-8814.
- 357. Meng, F., et al., The flavanol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide, disaggregates amyloid fibrils, and protects cultured cells against IAPP-induced toxicity. Biochemistry, 2010. **49**(37): p. 8127-33.
- 358. Jeon, S.Y., et al., Green tea catechins as a BACE1 (beta-secretase) inhibitor. Bioorg Med Chem Lett, 2003. 13(22): p. 3905-8.
- 359. Bieschke, J., et al., EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(17): p. 7710-5.
- 360. Ono, K., et al., Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's betaamyloid fibrils in vitro. J Neurosci Res, 2004. 75(6): p. 742-50.
- Yang, K.Y., et al., Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from Curcuma longa by LC-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. 853(1-2): p. 183-9.
- 362. Garcia-Alloza, M., et al., Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. J Neurochem, 2007. 102(4): p. 1095-104.

- 363. Lim, G.P., et al., The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. J Neurosci, 2001. 21(21): p. 8370-7.
- 364. Liu, H., et al., The inhibitory effects of different curcuminoids on beta-amyloid protein, beta-amyloid precursor protein and beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 in swAPP HEK293 cells. Neurosci Lett, 2010. **485**(2): p. 83-8.
- 365. Frautschy, S.A., et al., *Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology*. Neurobiol Aging, 2001. **22**(6): p. 993-1005.
- 366. Ladiwala, A.R., et al., Resveratrol selectively remodels soluble oligomers and fibrils of amyloid Abeta into off-pathway conformers. J Biol Chem, 2010. 285(31): p. 24228-37.
- 367. Marambaud, P., H. Zhao, and P. Davies, *Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37377-82.
- 368. Han, Y.S., et al., Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. Br J Pharmacol, 2004. 141(6): p. 997-1005.
- 369. Wang, J., et al., Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. FASEB J, 2006. 20(13): p. 2313-20.
- 370. Hartman, R.E., et al., *Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis, 2006. **24**(3): p. 506-15.
- 371. Kim, H.K., et al., *Effects of green tea polyphenol on cognitive and acetylcholinesterase activities.* Biosci Biotechnol Biochem, 2004. **68**(9): p. 1977-9.
- 372. Bastianetto, S., et al., Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against beta-amyloid-induced toxicity. Eur J Neurosci, 2006. 23(1): p. 55-64.
- 373. Choi, Y.T., et al., The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates betaamyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. Life Sci, 2001. 70(5): p. 603-14.
- 374. Levites, Y., et al., Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKCdependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. FASEB J, 2003. 17(8): p. 952-4.
- 375. Kim, D.S., S.Y. Park, and J.K. Kim, Curcuminoids from Curcuma longa L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from betaA(1-42) insult. Neurosci Lett, 2001. 303(1): p. 57-61.
- 376. Jang, J.H. and Y.J. Surh, Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. Free Radic Biol Med, 2003. 34(8): p. 1100-10.
- 377. Savaskan, E., et al., Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. Gerontology, 2003. 49(6): p. 380-3.
- Chen, C.Y., et al., Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 331(4): p. 993-1000.

- 379. Kim, S.J., et al., Epigallocatechin-3-gallate suppresses NF-kappaB activation and phosphorylation of p38 MAPK and JNK in human astrocytoma U373MG cells. J Nutr Biochem, 2007. 18(9): p. 587-96.
- 380. Giri, R.K., V. Rajagopal, and V.K. Kalra, Curcumin, the active constituent of turmeric, inhibits amyloid peptide-induced cytochemokine gene expression and CCR5-mediated chemotaxis of THP-1 monocytes by modulating early growth response-1 transcription factor. J Neurochem, 2004. 91(5): p. 1199-210.
- 381. Haque, A.M., et al., Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by Abeta1-40 in rats. J Nutr Biochem, 2008. 19(9): p. 619-26.
- 382. Sharma, M. and Y.K. Gupta, Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. Life Sci, 2002. 71(21): p. 2489-98.
- 383. Kumar, A., et al., Neuroprotective effects of resveratrol against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. Pharmacology, 2007. **79**(1): p. 17-26.
- 384. Ishrat, T., et al., Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). Eur Neuropsychopharmacol, 2009. 19(9): p. 636-47.
- 385. Joseph, J.A., et al., Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. J Neurosci, 1999. **19**(18): p. 8114-21.
- 386. Joseph, J.A., et al., Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. Nutr Neurosci, 2003. 6(3): p. 153-62.
- 387. Wang, Y., et al., Dietary supplementation with blueberries, spinach, or spirulina reduces ischemic brain damage. Exp Neurol, 2005. 193(1): p. 75-84.
- 388. Ganguli, M., et al., Ten-year incidence of dementia in a rural elderly US community population The MoVIES Project. Neurology, 2000. 54(5): p. 1109-1116.
- 389. Belkacemi, A., et al., *Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease*. Expert Rev Mol Med, 2011. **13**: p. e34.
- 390. Kiuchi, F., et al., Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1993. 41(9): p. 1640-3.
- Soni, K.B. and R. Kuttan, Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. Indian J Physiol Pharmacol, 1992. 36(4): p. 273-5.
- 392. Strimpakos, A.S. and R.A. Sharma, *Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials.* Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(3): p. 511-45.
- 393. Venkatesan, N., D. Punithavathi, and V. Arumugam, *Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats*. Br J Pharmacol, 2000. **129**(2): p. 231-4.

- 394. Joe, B. and B.R. Lokesh, Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. Biochim Biophys Acta, 1994. 1224(2): p. 255-63.
- 395. Sreejayan and M.N. Rao, *Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation*. J Pharm Pharmacol, 1994. **46**(12): p. 1013-6.
- 396. Cekmen, M., et al., Curcumin prevents oxidative renal damage induced by acetaminophen in rats. Food Chem Toxicol, 2009. 47(7): p. 1480-4.
- 397. El-Demerdash Fm Fau Yousef, M.I., F.M.E. Yousef Mi Fau Radwan, and F.M. Radwan, *Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and*. Food Chem Toxicol, 2009. **47**(1): p. 249-54 LID 10.1016/j.fct.2008.11.013 [doi].
- 398. Farhangkhoee, H., et al., Differential effects of curcumin on vasoactive factors in the diabetic rat heart. Nutr Metab (Lond), 2006. 3: p. 27.
- 399. Dairam, A., et al., Curcuminoids, curcumin, and demethoxycurcumin reduce leadinduced memory deficits in male Wistar rats. J Agric Food Chem, 2007. 55(3): p. 1039-44.
- 400. Ravindran, J., et al., Bisdemethylcurcumin and structurally related hispolon analogues of curcumin exhibit enhanced prooxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities in vitro. Biochem Pharmacol, 2010. **79**(11): p. 1658-66.
- 401. Sandur, S.K., et al., Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. Carcinogenesis, 2007. 28(8): p. 1765-73.
- 402. Bhaumik, S., et al., Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates. FEBS Lett, 1999. 456(2): p. 311-4.
- 403. Aggarwal, B.B., A. Kumar, and A.C. Bharti, Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. Anticancer Res, 2003. 23(1A): p. 363-98.
- 404. Cai, Y.Z., et al., Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. Life Sci, 2006. 78(25): p. 2872-88.
- 405. Jayaprakasha, G.K., et al., *Phenolic constituents in the fruits of Cinnamomum zeylanicum* and their antioxidant activity. J Agric Food Chem, 2006. **54**(5): p. 1672-9.
- 406. Chen, W.F., et al., Curcumin and its analogues as potent inhibitors of low density lipoprotein oxidation: H-atom abstraction from the phenolic groups and possible involvement of the 4-hydroxy-3-methoxyphenyl groups. Free Radic Biol Med, 2006. 40(3): p. 526-35.
- 407. Somparn, P., et al., Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. Biol Pharm Bull, 2007. **30**(1): p. 74-8.
- 408. Gorman, A.A., et al., Curcumin-derived transients: a pulsed laser and pulse radiolysis study. Photochem Photobiol, 1994. **59**(4): p. 389-98.

- 409. Schaich, K., C. Fisher, and R. King. Formation and Reactivity of Free Radicals in Curcuminoids. in An Electron Paramagnetic Resonance study, Phytochemicals for Cancer Prevention, ACS Symposium Series. 1994. ACS Publications.
- 410. Murugan, P. and L. Pari, Effect of tetrahydrocurcumin on plasma antioxidants in streptozotocin-nicotinamide experimental diabetes. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2006. 17(4): p. 231-44.
- 411. Murugan, P. and L. Pari, *Effect of tetrahydrocurcumin on lipid peroxidation and lipids in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006. **99**(2): p. 122-7.
- 412. Murugan, P. and L. Pari, Antioxidant effect of tetrahydrocurcumin in streptozotocinnicotinamide induced diabetic rats. Life Sci, 2006. 79(18): p. 1720-8.
- 413. Jeong, S.O., et al., Dimethoxycurcumin, a Synthetic Curcumin Analogue, Induces Heme Oxygenase-1 Expression through Nrf2 Activation in RAW264.7 Macrophages. J Clin Biochem Nutr, 2009. 44(1): p. 79-84.
- 414. Singh, U., et al., Reactions of reactive oxygen species (ROS) with curcumin analogues: Structure-activity relationship. Free Radic Res, 2011. 45(3): p. 317-25.
- 415. Singh, S. and B.B. Aggarwal, Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. J Biol Chem, 1995. 270(42): p. 24995-5000.
- 416. Jin, C.Y., et al., Curcumin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. Acta Pharmacol Sin, 2007. 28(10): p. 1645-51.
- 417. Xu, Y.X., et al., Curcumin inhibits IL1 alpha and TNF-alpha induction of AP-1 and NFkB DNA-binding activity in bone marrow stromal cells. Hematopathol Mol Hematol, 1997. 11(1): p. 49-62.
- 418. Wang, H.M., et al., *PPARgamma agonist curcumin reduces the amyloid-beta-stimulated inflammatory responses in primary astrocytes.* J Alzheimers Dis, 2010. **20**(4): p. 1189-99.
- 419. Hong, J., et al., Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A(2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. Carcinogenesis, 2004. 25(9): p. 1671-9.
- 420. Cho, J.W., K.S. Lee, and C.W. Kim, Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. Int J Mol Med, 2007. **19**(3): p. 469-74.
- 421. Begum, A.N., et al., Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **326**(1): p. 196-208.
- 422. Kim, H., et al., *Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid.* J Agric Food Chem, 2005. **53**(22): p. 8537-41.

- 423. Zhang, C., et al., Curcumin decreases amyloid-beta peptide levels by attenuating the maturation of amyloid-beta precursor protein. J Biol Chem, 2010. 285(37): p. 28472-80.
- 424. Ampasavate, C., et al., *Effects of Curcuma spp. on P-glycoprotein function*. Phytomedicine, 2010. **17**(7): p. 506-12.
- 425. Demeule, M., et al., Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump Pglycoprotein in the blood-brain barrier. Vascul Pharmacol, 2002. **38**(6): p. 339-48.
- 426. Romiti, N., et al., *Effects of curcumin on P-glycoprotein in primary cultures of rat hepatocytes*. Life Sci, 1998. **62**(25): p. 2349-58.
- 427. Park, S.Y., et al., Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. Food Chem Toxicol, 2008. 46(8): p. 2881-7.
- 428. Huang, H.C., et al., Curcumin attenuates amyloid-beta-induced tau hyperphosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells involving PTEN/Akt/GSK-3beta signaling pathway. J Recept Signal Transduct Res, 2014. **34**(1): p. 26-37.
- 429. Ma, Q.L., et al., Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. J Neurosci, 2009. **29**(28): p. 9078-89.
- 430. Ringman, J., et al., Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease. Neurology, 2008. 71(2): p. 85-92.
- 431. Dadhaniya P Fau Patel, C., et al., Safety assessment of a solid lipid curcumin particle preparation: acute and. Food Chem Toxicol, 2011. **49**(8): p. 1834-42 LID 10.1016/j.fct.2011.05.001 [doi].
- 432. Frautschy, S., et al., *Late-stage intervention with curcumin reduces soluble tau oligomers* and corrects cognitive and synaptic deficits. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, 2011. 7(4): p. S299-S300.
- 433. Shoba, G., et al., Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. Planta Med, 1998. 64(04): p. 353-356.
- 434. Cheng, A.L., et al., *Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions.* Anticancer Res, 2001. **21**(4B): p. 2895-900.
- 435. Ansari, M.J., et al., Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. J Pharm Biomed Anal, 2005. **39**(1-2): p. 132-8.
- 436. Wang, Y.J., et al., Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. J Pharm Biomed Anal, 1997. **15**(12): p. 1867-76.
- 437. Anand, P., et al., *Bioavailability of curcumin: problems and promises*. Molecular pharmaceutics, 2007. 4(6): p. 807-818.
- 438. Yang Ky Fau Lin, L.-C., et al., Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from Curcuma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. 853(1-2): p. 183-9.

- 439. Pan, M.H., T.M. Huang, and J.K. Lin, *Biotransformation of curcumin through reduction* and glucuronidation in mice. Drug Metab Dispos, 1999. 27(4): p. 486-94.
- 440. Ravindranath, V. and N. Chandrasekhara, *Absorption and tissue distribution of curcumin in rats.* Toxicology, 1980. **16**(3): p. 259-65.
- 441. Cheng Al Fau Hsu, C.H., et al., *Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with.* Anticancer Res, 2001. 21(4B): p. 2895-900.
- 442. Wahlang, B., Y.B. Pawar, and A.K. Bansal, *Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model.* Eur J Pharm Biopharm, 2011. 77(2): p. 275-82.
- 443. Ireson, C., et al., Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. Cancer Res, 2001. 61(3): p. 1058-64.
- 444. Vareed, S.K., et al., *Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy* human subjects. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. 17(6): p. 1411-7.
- 445. Perkins S Fau Verschoyle, R.D., et al., *Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics* of curcumin in the min/+ mouse, a. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002. 11(6): p. 535-40.
- 446. Manju, S. and K. Sreenivasan, Synthesis and characterization of a cytotoxic cationic polyvinylpyrrolidone-curcumin conjugate. J Pharm Sci, 2011. **100**(2): p. 504-11.
- 447. Setthacheewakul, S., et al., Development and evaluation of self-microemulsifying liquid and pellet formulations of curcumin, and absorption studies in rats. Eur J Pharm Biopharm, 2010. **76**(3): p. 475-85.
- 448. Ghosh, M., et al., *Curcumin nanodisks: formulation and characterization*. Nanomedicine, 2011. 7(2): p. 162-7.
- 449. Gupta, N.K. and V.K. Dixit, *Bioavailability enhancement of curcumin by complexation* with phosphatidyl choline. J Pharm Sci, 2011. **100**(5): p. 1987-95.
- 450. Takahashi, M., et al., Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. J Agric Food Chem, 2009. 57(19): p. 9141-6.
- 451. Shaikh, J., et al., Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. Eur J Pharm Sci, 2009. **37**(3-4): p. 223-30.
- 452. Royal Society and Royal Academy of Engineering, *Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties*. 2004, London: Royal Society. 116.
- 453. Nel, A.E., et al., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. Nature Materials, 2009. 8(7): p. 543-557.
- 454. Rejman, J., et al., Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrinand caveolae-mediated endocytosis. Biochemical Journal, 2004. 377: p. 159-169.

- 455. Shin Mc Fau Zhang, J., et al., Cell-penetrating peptides: Achievements and challenges in application for cancer LID 10.1002/jbm.a.34859 [doi]. J Biomed Mater Res A, 2013.
- 456. Yewale C Fau Baradia, D., et al., *Proteins: emerging carrier for delivery of cancer* therapeutics. Expert Opin Drug Deliv, 2013.
- 457. Bakhru Sh Fau Furtado, S., et al., Oral delivery of proteins by biodegradable nanoparticles. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(6): p. 811-21 LID 10.1016/j.addr.2013.04.006 [doi] LID S0169-409X(13)00066-5 [pii].
- 458. Hans, M. and A. Lowman, *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2002. **6**(4): p. 319-327.
- 459. Panyam, J. and V. Labhasetwar, *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery* to cells and tissue. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. 64, Supplement(0): p. 61-71.
- 460. Kim, H.R., et al., Analysis of plasma protein adsorption onto PEGylated nanoparticles by complementary methods: 2-DE, CE and Protein Lab-on-chip system. Electrophoresis, 2007. **28**(13): p. 2252-61.
- 461. Kim, H.R., et al., Low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis of PEGylated nanoparticles in rat brain endothelial cells. Cell Mol Life Sci, 2007. 64(3): p. 356-64.
- 462. Kim, H.R., et al., Translocation of poly(ethylene glycol-co-hexadecyl)cyanoacrylate nanoparticles into rat brain endothelial cells: role of apolipoproteins in receptor-mediated endocytosis. Biomacromolecules, 2007. 8(3): p. 793-9.
- 463. Makadia, H.K. and S.J. Siegel, *Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier*. Polymers, 2011. **3**(3): p. 1377-1397.
- 464. Bertrand, N. and J.C. Leroux, *The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective.* J Control Release, 2012. **161**(2): p. 152-63.
- 465. Kimura, Y., et al., Ring-opening polymerization of 3 (S)-[(benzyloxycarbonyl) methyl]-1, 4-dioxane-2, 5-dione: a new route to a poly (. alpha.-hydroxy acid) with pendant carboxyl groups. Macromolecules, 1988. 21(11): p. 3338-3340.
- 466. Athanasiou, K.A., G.G. Niederauer, and C.M. Agrawal, Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. Biomaterials, 1996. 17(2): p. 93-102.
- 467. Shive, M.S. and J.M. Anderson, *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. **28**(1): p. 5-24.
- 468. Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray, *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice*. Pharmacological reviews, 2001. **53**(2): p. 283-318.
- 469. Soppimath, K.S., et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. Journal of Controlled Release, 2001. **70**(1): p. 1-20.
- 470. Jain, R.A., The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-< i> co</i>-glycolide)(PLGA) devices. Biomaterials, 2000. 21(23): p. 2475-2490.

- 471. Nair, L.S. and C.T. Laurencin, *Biodegradable polymers as biomaterials*. Progress in polymer science, 2007. **32**(8): p. 762-798.
- 472. Gall, C.B.L., et al., *MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE PROTHESE VASCULAIRE* EN POLYESTER IMPREGNEE D'UNE MATRICE SYNTHETIQUE BIODEGRADABLE. 164.
- 473. Lindsay, P.C., et al., The effect of add-back treatment with tibolone (Livial) on patients treated with the gonadotropin-releasing hormone agonist triptorelin (Decapeptyl). Fertil Steril, 1996. **65**(2): p. 342-8.
- 474. Cosson, M., et al., Dienogest is as effective as triptorelin in the treatment of endometriosis after laparoscopic surgery: results of a prospective, multicenter, randomized study. Fertility and Sterility, 2002. 77(4): p. 684-692.
- 475. Allison, S.D., Effect of structural relaxation on the preparation and drug release behavior of poly(lactic-co-glycolic)acid microparticle drug delivery systems. J Pharm Sci, 2008. 97(6): p. 2022-35.
- 476. Mundargi, R.C., et al., Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives. Journal of Controlled Release, 2008. 125(3): p. 193-209.
- 477. Mohamed, F. and C.F. van der Walle, *Engineering biodegradable polyester particles* with specific drug targeting and drug release properties. J Pharm Sci, 2008. **97**(1): p. 71-87.
- 478. Ramchandani, M. and D. Robinson, *In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants.* J Control Release, 1998. **54**(2): p. 167-75.
- 479. Amann, L.C., et al., In vitro-in vivo correlations of scalable PLGA-risperidone implants for the treatment of schizophrenia. Pharmaceutical Research, 2010. 27(8): p. 1730-7.
- 480. Crotts, G. and T.G. Park, Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. J Microencapsul, 1998. 15(6): p. 699-713.
- 481. Sant, S., M. Thommes, and P. Hildgen, *Microporous structure and drug release kinetics* of polymeric nanoparticles. Langmuir, 2008. 24(1): p. 280-7.
- 482. Faisant, N., J. Siepmann, and J.P. Benoit, *PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release.* Eur J Pharm Sci, 2002. **15**(4): p. 355-66.
- 483. Siegel, S.J., et al., *Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices*. Eur J Pharm Biopharm, 2006. **64**(3): p. 287-93.
- 484. Lu, L., et al., In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. Biomaterials, 2000. 21(18): p. 1837-45.
- 485. Park, T.G., Degradation of poly (D, L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. Journal of Controlled Release, 1994. 30(2): p. 161-173.

- 486. Frank, A., S.K. Rath, and S.S. Venkatraman, *Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition*. J Control Release, 2005. **102**(2): p. 333-44.
- 487. Grizzi, I., et al., Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) sizedependence. Biomaterials, 1995. 16(4): p. 305-11.
- 488. Holy, C.E., et al., *In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam.* Biomaterials, 1999. **20**(13): p. 1177-85.
- 489. Zolnik, B.S. and D.J. Burgess, *Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release*. J Control Release, 2007. **122**(3): p. 338-44.
- 490. Burkersroda, F.v., L. Schedl, and A. Göpferich, *Why degradable polymers undergo* surface erosion or bulk erosion. Biomaterials, 2002. 23(21): p. 4221-4231.
- 491. Eniola, A.O. and D.A. Hammer, *Characterization of biodegradable drug delivery* vehicles with the adhesive properties of leukocytes II: effect of degradation on targeting activity. Biomaterials, 2005. **26**(6): p. 661-70.
- 492. Niwa, T., et al., In vitro drug release behavior of D, L lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres with nafarelin acetate prepared by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method. J Pharm Sci, 1994. 83(5): p. 727-732.
- 493. Allemann, E., et al., In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. Pharmaceutical Research, 1993. 10(12): p. 1732-7.
- 494. Barichello, J.M., et al., *Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method.* Drug Development and Industrial Pharmacy, 1999. **25**(4): p. 471-476.
- 495. Bodmeier, R. and J.W. McGinity, *The preparation and evaluation of drug-containing poly (dl-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method.* Pharmaceutical Research, 1987. 4(6): p. 465-471.
- 496. Panyam J Fau Labhasetwar, V. and V. Labhasetwar, Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide). Pharmaceutical Research, 2003. 20(2): p. 212-20.
- 497. Vasir, J.K. and V. Labhasetwar, *Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(8): p. 718-28.
- 498. Danhier, F., et al., *PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications*. J Control Release, 2012. **161**(2): p. 505-22.
- 499. Foged, C., et al., Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. International journal of pharmaceutics, 2005. 298(2): p. 315-322.
- 500. Vasir, J.K. and V. Labhasetwar, Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. Biomaterials, 2008. 29(31): p. 4244-52.

- 501. Yue, Z.G., et al., Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. Biomacromolecules, 2011. **12**(7): p. 2440-6.
- 502. Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, *Biodegradable polymeric nanoparticles based* drug delivery systems. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 1-18.
- 503. Muller, R.H., C. Jacobs, and O. Kayser, Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. Adv Drug Deliv Rev, 2001. 47(1): p. 3-19.
- 504. Gaumet, M., et al., Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. Eur J Pharm Biopharm, 2008. 69(1): p. 1-9.
- 505. Vonarbourg A Fau Passirani, C., et al., *Evaluation of pegylated lipid nanocapsules* versus complement system activation. J Biomed Mater Res A, 2006. **78**(3): p. 620-8.
- 506. Elsabahy, M. and K.L. Wooley, *Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications*. Chem Soc Rev, 2012. **41**(7): p. 2545-61.
- 507. Skotland, T., T.G. Iversen, and K. Sandvig, *Comment on "short ligands affect modes of QD uptake and elimination in human cells"*. ACS Nano, 2011. **5**(10): p. 7690; author reply 7691-2.
- 508. Avgoustakis, K., et al., Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles. Int J Pharm, 2003. 259(1-2): p. 115-27.
- 509. Beletsi, A., Z. Panagi, and K. Avgoustakis, *Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers*. Int J Pharm, 2005. **298**(1): p. 233-41.
- 510. Yamaoka, T., Y. Tabata, and Y. Ikada, Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. J Pharm Sci, 1994. 83(4): p. 601-6.
- 511. Panagi, Z., et al., Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. Int J Pharm, 2001. 221(1-2): p. 143-52.
- 512. Otsuka, H., Y. Nagasaki, and K. Kataoka, *PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. 55(3): p. 403-19.
- 513. Jung, T., et al., Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. 50(1): p. 147-160.
- 514. Jani, P., et al., *The Uptake and Translocation of Latex Nanospheres and Microspheres after Oral-Administration to Rats.* Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1989. **41**(12): p. 809-&.
- 515. Delie, F., Evaluation of nano- and microparticle uptake by the gastrointestinal tract. Adv Drug Deliv Rev, 1998. 34(2-3): p. 221-233.
- 516. Ebel, J.P., A method for quantifying particle absorption from the small intestine of the mouse. Pharmaceutical Research, 1990. 7(8): p. 848-51.

- 517. Pappo, J. and T.H. Ermak, Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake. Clin Exp Immunol, 1989. **76**(1): p. 144-8.
- 518. Scherer, D., et al., In vitro permeability of PBCA nanoparticles through porcine small intestine. J Drug Target, 1993. 1(1): p. 21-7.
- 519. Frey, A., et al., Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. J Exp Med, 1996. 184(3): p. 1045-59.
- 520. Desai, M.P., et al., *The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent.* Pharmaceutical Research, 1997. **14**(11): p. 1568-1573.
- 521. LeFevre, M.E., A.M. Boccio, and D.D. Joel, Intestinal uptake of fluorescent microspheres in young and aged mice. Proc Soc Exp Biol Med, 1989. 190(1): p. 23-7.
- 522. Seifert, J., B. Haraszti, and W. Sass, *The influence of age and particle number on absorption of polystyrene particles from the rat gut.* J Anat, 1996. **189 (Pt 3):** p. 483-6.
- 523. Landry, F.B., et al., Peroral administration of 14C-poly(D,L-lactic acid) nanoparticles coated with human serum albumin or polyvinyl alcohol to guinea pigs. J Drug Target, 1998. 6(4): p. 293-307.
- 524. Desai, M.P., et al., Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. Pharmaceutical Research, 1996. 13(12): p. 1838-1845.
- 525. Tabata, Y., Y. Inoue, and Y. Ikada, Size effect on systemic and mucosal immune responses induced by oral administration of biodegradable microspheres. Vaccine, 1996. 14(17): p. 1677-1685.
- 526. Damge, C., et al., Intestinal absorption of PLAGA microspheres in the rat. J Anat, 1996. 189: p. 491-501.
- 527. Leung, M.H. and T.W. Kee, *Effective stabilization of curcumin by association to plasma proteins: human serum albumin and fibrinogen.* Langmuir, 2009. **25**(10): p. 5773-7.
- 528. Lockman, P.R., et al., *Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2002. **28**(1): p. 1-13.
- 529. Sahni, J.K., et al., Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease. J Control Release, 2011. 152(2): p. 208-31.
- 530. Wohlfart, S., S. Gelperina, and J. Kreuter, *Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles*. Journal of Controlled Release, 2012. **161**(2): p. 264-273.
- 531. Roney, C., et al., Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. Journal of Controlled Release, 2005. 108(2-3): p. 193-214.
- 532. Wilson, B., et al., Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. Nanomedicine, 2010. 6(1): p. 144-52.
- 533. Wilson, B., et al., *Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **70**(1): p. 75-84.

- 534. Siegemund, T., et al., Thioflavins released from nanoparticles target fibrillar amyloid beta in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. Int J Dev Neurosci., 2006. 24(2-3): p. 195-201. Epub 2005 Dec 28.
- 535. Härtig, W., et al., Electron microscopic analysis of nanoparticles delivering thioflavin-T after intrahippocampal injection in mouse: implications for targeting  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease. Neurosci Lett, 2003. **338**(2): p. 174-176.
- 536. Kreuter, J., et al., Passage of Peptides through the Blood-Brain-Barrier with Colloidal Polymer Particles (Nanoparticles). Brain Res, 1995. 674(1): p. 171-174.
- 537. Dudhani, A.R. and S.L. Kosaraju, *Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization*. Carbohydrate Polymers, 2010. **81**(2): p. 243-251.
- 538. Dube, A., J.A. Nicolazzo, and I. Larson, *Chitosan nanoparticles enhance the intestinal absorption of the green tea catechins (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate.* Eur J Pharm Sci, 2010. **41**(2): p. 219-25.
- 539. Smith, A., et al., Nanolipidic particles improve the bioavailability and alpha-secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease. Int J Pharm, 2010. **389**(1-2): p. 207-12.
- 540. Lu, X., et al., Resveratrol-loaded polymeric micelles protect cells from Abeta-induced oxidative stress. Int J Pharm, 2009. 375(1-2): p. 89-96.
- 541. Lu, X., et al., Enhanced Neuroprotective Effects of Resveratrol Delivered by Nanoparticles on Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in Rat Cortical Cell Culture. Molecular pharmaceutics, 2013. 10(5): p. 2045-2053.
- Yallapu, M.M., et al., Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. J Colloid Interface Sci, 2010. 351(1): p. 19-29.
- Mukerjee, A. and J.K. Vishwanatha, Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. Anticancer Res, 2009. 29(10): p. 3867-75.
- 544. Bisht, S., et al., Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. J Nanobiotechnology, 2007. 5: p. 3.
- 545. Sahu, A., et al., Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. Acta Biomater, 2008. 4(6): p. 1752-61.
- 546. Duan, J., et al., Synthesis and in vitro/in vivo anti-cancer evaluation of curcumin-loaded chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. Int J Pharm, 2010. 400(1-2): p. 211-20.
- 547. Sahu, A., N. Kasoju, and U. Bora, Fluorescence study of the curcumin-casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells. Biomacromolecules, 2008. 9(10): p. 2905-12.
- 548. Mohanty, C. and S.K. Sahoo, *The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation*. Biomaterials, 2010. **31**(25): p. 6597-611.

- 549. Cui, J., et al., Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems. Int J Pharm, 2009. 371(1-2): p. 148-55.
- 550. Song, Z., et al., Curcumin-loaded PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles: Preparation, pharmacokinetics and distribution in vivo. J Colloid Interface Sci, 2011. 354(1): p. 116-23.
- 551. Sun, M., et al., Enhancement of transport of curcumin to brain in mice by poly (nbutylcyanoacrylate) nanoparticle. Journal of Nanoparticle Research, 2010. 12(8): p. 3111-3122.
- 552. Tsai, Y.-M., et al., Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration. International journal of pharmaceutics, 2011. 416(1): p. 331-338.
- 553. Martel, C.L., et al., Isoform Specific Effects of Apolipoproteins E2, E3, and E4 on Cerebral Capillary Sequestration and Blood - Brain Barrier Transport of Circulating Alzheimer's Amyloid β. J Neurochem, 1997. 69(5): p. 1995-2004.
- 554. Khumsupan, P., et al., Apolipoprotein E LDL receptor-binding domain-containing highdensity lipoprotein: a nanovehicle to transport curcumin, an antioxidant and antiamyloid bioflavonoid. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(1): p. 352-9.
- 555. Mulik, R.S., et al., ApoE3 mediated poly(butyl) cyanoacrylate nanoparticles containing curcumin: study of enhanced activity of curcumin against beta amyloid induced cytotoxicity using in vitro cell culture model. Mol Pharm, 2010. 7(3): p. 815-25.
- 556. Ray, B., et al., Neuroprotective and neurorescue effects of a novel polymeric nanoparticle formulation of curcumin (NanoCurc<sup>™</sup>) in the neuronal cell culture and animal model: implications for Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's Disease, 2011. 23(1): p. 61-77.
- 557. Rejman, J., et al., Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrinand caveolae-mediated endocytosis. Biochem J, 2004. 377(Pt 1): p. 159-69.
- 558. Chen, H., et al., Oral delivery of DMAB-modified docetaxel-loaded PLGA-TPGS nanoparticles for cancer chemotherapy. Nanoscale Res Lett, 2011. 6(1): p. 1-10.
- 559. Nel, A., et al., *Toxic potential of materials at the nanolevel.* Science, 2006. **311**(5761): p. 622-627.
- 560. Anand, P., et al., Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. Biochem Pharmacol, 2010. **79**(3): p. 330-8.
- 561. Reddy, M.K., et al., Superoxide dismutase-loaded PLGA nanoparticles protect cultured human neurons under oxidative stress. Appl Biochem Biotechnol, 2008. 151(2-3): p. 565-77.
- 562. Makadia, H.K. and S.J. Siegel, *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier*. Polymers (Basel), 2011. **3**(3): p. 1377-1397.
- 563. Chereddy, K.K., et al., Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. Journal of Controlled Release, 2013. 171(2): p. 208-215.

- 564. Xie, X., et al., *PLGA nanoparticles improve the oral bioavailability of curcumin in rats: characterizations and mechanisms.* J Agric Food Chem, 2011. **59**(17): p. 9280-9.
- 565. Kwon, H.-Y., et al., Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. 182(1-3): p. 123-130.
- 566. Hariharan, S., et al., Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy. Pharm Res, 2006. 23(1): p. 184-95.
- 567. Zhang, X., et al., Curcumin activates Wnt/β-catenin signaling pathway through inhibiting the activity of GSK-3β in APPswe transfected SY5Y cells. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. **42**(5): p. 540-546.
- 568. Dang, T.N., et al., Molecular regulations induced by acrolein in neuroblastoma SK-N-SH cells: relevance to Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, 2010. 21(4): p. 1197-216.
- 569. Manach, C., et al., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies.* Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1): p. 230S-242S.
- 570. Mittal, G., et al., Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology. J Control Release, 2011. **150**(2): p. 220-8.
- 571. Jeffery, H., S.S. Davis, and D.T. O'Hagan, The preparation and characterization of poly (lactide-co-glycolide) microparticles. II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion solvent evaporation technique. Pharmaceutical Research, 1993. 10(3): p. 362-368.
- 572. Song, X., et al., Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. 69(2): p. 445-453.
- 573. des Rieux, A., et al., An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells. Eur J Pharm Sci, 2007. 30(5): p. 380-91.
- 574. Chen, M.C., et al., A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. Biomaterials, 2011. **32**(36): p. 9826-9838.
- 575. Stolnik, S., et al., The colloidal properties of surfactant-free biodegradable nanospheres from  $poly(\beta$ -malic acid-co-benzyl malate)s and poly(lactic acid-co-glycolide). Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1995. **97**(3): p. 235-245.
- 576. Sonaje, K., et al., Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. Pharmaceutical Research, 2007. 24(5): p. 899-908.
- 577. Swarnakar, N.K., et al., Oral bioavailability, therapeutic efficacy and reactive oxygen species scavenging properties of coenzyme Q10-loaded polymeric nanoparticles. Biomaterials, 2011. 32(28): p. 6860-6874.
- 578. Sinha, V.R. and A. Trehan, *Biodegradable microspheres for protein delivery*. J Control Release, 2003. **90**(3): p. 261-80.

- 579. Tsuji, H., A. Mizuno, and Y. Ikada, Properties and morphology of poly (L = lactide). III. Effects of initial crystallinity on long - term in vitro hydrolysis of high molecular weight poly (L - lactide) film in phosphate - buffered solution. Journal of Applied Polymer Science, 2000. 77(7): p. 1452-1464.
- 580. Schliecker, G., et al., *Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity.* Int J Pharm., 2003. **266**(1-2): p. 39-49.
- 581. D'Souza, S.S. and P.P. DeLuca, *Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems*. Pharmaceutical Research, 2006. 23(3): p. 460-474.
- 582. Whittemore, E., et al., A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. Neuroscience, 1995. 67(4): p. 921-932.
- 583. Businaro, R., et al., S100B protects LAN 5 neuroblastoma cells against  $A \beta$  amyloid induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases  $A \beta$  amyloid neurotoxicity at high doses. J Neurosci Res, 2006. **83**(5): p. 897-906.
- 584. Ooi, L., et al., Induced pluripotent stem cells as tools for disease modelling and drug discovery in Alzheimer's disease. Journal of Neural Transmission, 2013. 120(1): p. 103-111.
- 585. Loeffler, M. and I. Roeder, *Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models-a conceptual approach.* Cells Tissues Organs, 2002. **171**(1): p. 8-26.
- 586. Biedler, J.L., L. Helson, and B.A. Spengler, Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. Cancer Res, 1973. 33(11): p. 2643-52.
- 587. Kovalevich, J. and D. Langford, Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. Methods Mol Biol., 2013. 1078:9-21.(doi): p. 10.1007/978-1-62703-640-5\_2.
- 588. Biedler, J.L., et al., Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. Cancer Res, 1978. **38**(11 Pt 1): p. 3751-7.
- 589. Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster, Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ Health Perspect., 2005. 113(7): p. 823-39.
- 590. Nel, A., et al., *Toxic potential of materials at the nanolevel.* Science, 2006. **311**(5761): p. 622-627.
- 591. Li, N., et al., Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. Environ Health Perspect., 2003. 111(4): p. 455-60.
- 592. Xia, T., et al., Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. ACS Nano., 2008. 2(1): p. 85-96. doi: 10.1021/nn700256c.
- 593. Kim, D., et al., Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005. 40(2): p. 83-91.

- 594. Peritore, C.S., et al., Resveratrol attenuates L-DOPA-induced hydrogen peroxide toxicity in neuronal cells. Neuroreport, 2012. 23(17): p. 989-94.
- 595. Sattayasai, J., et al., Protective effects of mangosteen extract on H2O2-induced cytotoxicity in SK-N-SH cells and scopolamine-induced memory impairment in mice. PLoS One, 2013. 8(12): p. e85053.
- 596. Weissmann, G., *The role of lysosomes in inflammation and disease*. Annual review of medicine, 1967. **18**(1): p. 97-112.
- 597. Panyam, J., et al., Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. FASEB J, 2002. 16(10): p. 1217-26.
- 598. Yang, C., et al., Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. Brain Res, 2009. **1282**(0): p. 133-141.
- 599. Motterlini, R., et al., Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine, 2000. 28(8): p. 1303-1312.
- 600. Maheshwari, R.K., et al., *Multiple biological activities of curcumin: A short review*. Life Sci, 2006. **78**(18): p. 2081-2087.
- 601. Jena, S. and G.B.N. Chainy, Regulation of expression of antioxidant enzymes by vitamin E and curcumin in l-thyroxine-induced oxidative stress in rat renal cortex. Mol Biol Rep, 2011. 38(2): p. 1047-1054.
- 602. Ligeret, H., et al., *Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial* permeability transition pore. Free Radical Biology and Medicine, 2004. **36**(7): p. 919-929.
- 603. Reddy, P.H., Mitochondrial oxidative damage in aging and Alzheimer's disease: implications for mitochondrially targeted antioxidant therapeutics. BioMed Research International, 2006. 2006.
- 604. Hemmerich, P.H. and A.H. von Mikecz, *Defining the subcellular interface of nanoparticles by live-cell imaging*. PLoS One., 2013. **8**(4): p. e62018. doi: 10.1371/journal.pone.0062018. Print 2013.
- 605. Sharma, A., et al., Design and evaluation of multifunctional nanocarriers for selective delivery of coenzyme Q10 to mitochondria. Biomacromolecules, 2011. 13(1): p. 239-252.
- 606. Han, L., et al., Inhibitory effects of trolox-encapsulated chitosan nanoparticles on tertbutylhydroperoxide induced RAW264. 7 apoptosis. Biomaterials, 2012.
- 607. Ghosh, D., K.R. Levault, and G.J. Brewer, Dual-energy precursor and nuclear erythroidrelated factor 2 activator treatment additively improve redox glutathione levels and neuron survival in aging and Alzheimer mouse neurons upstream of reactive oxygen species. Neurobiol Aging, 2013. 15(13): p. 00284-4.
- 608. Tan, L., et al., The Toll-->NFkappaB signaling pathway mediates the neuropathological effects of the human Alzheimer's Abeta42 polypeptide in Drosophila. PLoS One., 2008. 3(12): p. e3966. doi: 10.1371/journal.pone.0003966. Epub 2008 Dec 17.

- 609. Gao, C., et al., GSK3: a key target for the development of novel treatments for type 2 diabetes mellitus and Alzheimer disease. Rev Neurosci., 2011. 23(1): p. 1-11. doi: 10.1515/rns.2011.061.
- 610. Singh, M., V. Murthy, and C. Ramassamy, Modulation of hydrogen peroxide and acrolein-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunctions and redox regulated pathways by the Bacopa monniera extract: potential implication in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, 2010. 21(1): p. 229-47.
- Cho, Y., R. Shi, and R. Ben Borgens, Chitosan nanoparticle-based neuronal membrane sealing and neuroprotection following acrolein-induced cell injury. J Biol Eng, 2010. 4(1): p. 2.
- 612. Mathew, A., et al., Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 peptide for potential use in Alzheimer's disease. PLoS One, 2012. 7(3): p. e32616.
- 613. Merrell, J.G., et al., *Curcumin-loaded poly(ε-caprolactone) nanofibres: Diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties.* Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2009. **36**(12): p. 1149-1156.
- 614. Xie, W., P. Xu, and Q. Liu, Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. Bioorg Med Chem Lett, 2001. 11(13): p. 1699-701.
- 615. Partha, R. and J.L. Conyers, *Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials*. Int J Nanomedicine, 2009. 4: p. 261-75.
- 616. Zhang, Y.G. and L.Y. Tao, [Recent advances of NF-kappaB in nervous system injury]. Fa Yi Xue Za Zhi., 2008. 24(6): p. 453-6.
- 617. Woo, M.-S., et al., Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astroglioma cells. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 335(4): p. 1017-1025.
- 618. Ballatore, C., V.M.-Y. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders*. Nature Reviews Neuroscience, 2007. **8**(9): p. 663-672.
- 619. Balaraman, Y., et al., Glycogen synthase kinase  $3\beta$  and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2006. 63(11): p. 1226-1235.
- 620. Hoppe, J.B., et al., *Free and nanoencapsulated curcumin suppress* β-amyloid-induced cognitive impairments in rats: Involvement of BDNF and Akt/GSK-3β signaling pathway. Neurobiology of Learning and Memory, 2013. **106**(0): p. 134-144.
- 621. Hu, J.-P., et al., Valproate reduces tau phosphorylation via cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 signaling pathways. Brain Res Bull, 2011. **85**(3–4): p. 194-200.
- 622. Squires, M.S., et al., Relevance of mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphotidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) pathways to induction of apoptosis by curcumin in breast cells. Biochem Pharmacol, 2003. 65(3): p. 361-376.

- 623. Loo, J.S., C.P. Ooi, and F.Y. Boey, Degradation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA) by electron beam radiation. Biomaterials, 2005. 26(12): p. 1359-67.
- 624. Kreuter, J., Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know? Adv Drug Deliv Rev, 2013. 24(13): p. 00191-9.
- 625. Ali, J., et al., Potential of nanoparticulate drug delivery systems by intranasal administration. Curr Pharm Des, 2010. 16(14): p. 1644-53.
- 626. Landsiedel, R., et al., *Toxico-/biokinetics of nanomaterials*. Arch Toxicol., 2012. **86**(7): p. 1021-60. doi: 10.1007/s00204-012-0858-7. Epub 2012 May 11.
- 627. Faraji, A.H. and P. Wipf, *Nanoparticles in cellular drug delivery*. Bioorg Med Chem, 2009. 17(8): p. 2950-2962.
- 628. Bernal, G.M., et al., Convection-enhanced delivery and in vivo imaging of polymeric nanoparticles for the treatment of malignant glioma. Nanomedicine, 2013. 24(13): p. 00343-2.
- 629. Yang, H., Nanoparticle-mediated brain-specific drug delivery, imaging, and diagnosis. Pharmaceutical Research, 2010. 27(9): p. 1759-1771.
- 630. Dallasta, L.M., et al., *Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis.* The American journal of pathology, 1999. **155**(6): p. 1915-1927.
- 631. Lu, J.M., et al., Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. Expert Rev Mol Diagn, 2009. 9(4): p. 325-41.
- 632. Liu, Y., H. Miyoshi, and M. Nakamura, Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. Int J Cancer., 2007. 120(12): p. 2527-37.
- 633. Torchilin, V.P., Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. Aaps J., 2007. 9(2): p. E128-47.
- 634. Gref, R., et al., 'Stealth'corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2000. 18(3): p. 301-313.
- 635. Chang, J., et al., Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier. International journal of pharmaceutics, 2009. 379(2): p. 285-292.
- 636. Mulik, R., et al., ApoE3 mediated poly (butyl) cyanoacrylate nanoparticles containing curcumin: study of enhanced activity of curcumin against beta amyloid induced cytotoxicity using in vitro cell culture model. Molecular pharmaceutics, 2010. 7(3): p. 815.