

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

SYNTHÈSE, CARACTÉRISATION ET ANALYSE DE L'EFFET NEUROPROTECTEUR D'UN SYSTÈME NANOPARTICULAIRE DE TYPE PLGA

Par
DJIOKENG PAKA Ghislain

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.)
en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

Pre. Annie Castonguay
INRS-Institut Armand-Frappier
Laval, Canada

Directeur de recherche

Pr. Charles Ramassamy
INRS-Institut Armand-Frappier
Laval, Canada

Examineurs externes

Pr. Nicolas Bertrand
Université Laval
Québec, Canada
Pr. Patrick Gosselin
Corealis Pharma, Inc.
Laval, Canada

REMERCIEMENTS

Tout travail de recherche étant l'aboutissement des efforts de nombreuses âmes de bonne volonté, j'aimerais remercier toutes celles qui y ont été impliqués directement ou indirectement. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance et que Dieu vous bénisse.

J'ai eu la chance de réaliser les activités de recherche de cette thèse au sein des laboratoires du prestigieux centre de **l'INRS-Institut Armand-Frappier**, principalement au sein du laboratoire du Pr. Charles Ramassamy.

D'entrée, il me tient à cœur d'exprimer ma sincère gratitude à mon directeur de recherche, le **Pr. Charles Ramassamy** qui m'a aussi chaleureusement accueilli dans son équipe de recherche. Un grand merci d'avoir cru en moi, peut-être un peu trop pour me confier ce projet passionnant! Votre patience et vos encouragements multiformes m'ont toujours accompagné, surtout dans les moments les plus exaspérants. Vous avez toujours su, malgré vos multiples responsabilités, consacrer du temps pour un meilleur aboutissement de ce travail. Personnellement, cette expérience fut mémorable et édifiante aussi. Acceptez ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je remercie les membres du jury pour qui ont consacré du temps à l'affinage de mon manuscrit de thèse. Ce travail porte l'estampille de leur expertise respective. Merci au **Pre. Annie Castonguay** d'avoir accepté la présidence de ce jury, au **Pr. Nicolas Bertrand** et au **Pr. Patrick Gosselin** d'avoir participé à titre d'évaluateurs externes. Merci énormément à chacun de vous.

Tout au long de mes examens doctoraux, j'ai eu comme membre du jury le **Pr. Patrice Hildgen**, la **Pre. Gaëlle Roullin**, le **Pr. Xavier Banquy**, le **Pr. Marc Gauthier** et la **Pre. Annie Castonguay**. Vos commentaires, vos suggestions, vos questions et critiques ont toujours été pertinents, constructifs et orientationnels. Ils auront contribué à améliorer ce travail. Merci encore.

A tous les membres de l'équipe du Pr. Charles Ramassamy dont j'ai eu l'honneur de côtoyer ces dernières années, notamment **Dr. Jean Michel Rabanel, Dre. Sihem Doggui, Dr. Abdenour Belkacemi, Morgane Perrotte, Morgane Lambert, Ahlem Zaghmi, Vincent Hervé, Mohamed Haddad**, merci pour ces moments parsemés de haut et de bas. Il ne me reste que de beaux souvenirs. Merci à tous les co-auteurs de mes articles et à tous les stagiaires. Impossible d'oublier les membres de l'équipe des Prs. Gaëlle Roullin et Xavier Banquy de l'UdM, plus particulièrement à **Jimmy Faivre et Soudeh F. Tehrani** pour toute l'ouverture lors de nos nombreuses discussions.

Je dis merci à l'extrême sollicitude de mes voisins du PRF. Merci aux **Prs. Géraldine Delbès, Monique Lacroix, David Chatenet et Daniel Cyr** et à leurs équipes respectives pour leur aide précieuse. Un merci particulier à **Myriam Letourneau** pour nos discussions scientifiques, toujours enrichissantes. Merci au **Pr. Julius Oben**, responsable du laboratoire de Nutrition et de Biochimie Nutritionnelle de l'université de Yaoundé 1.

Merci également aux membres de l'équipe de soccer **Institut Armand-Frappier-Football Club (IAF-FC)** pour tous nos moments de détente autour du *ballon rond*. Des moments vraiment appréciés!

Un vibrant merci à tous les organismes subventionnaires qui ont accompagné ce projet. Je citerai la **Chaire Louise et André Charron** sur la maladie d'Alzheimer, le **CRSNG, le FQRNT**. Merci à **Fondation Armand-Frappier** pour la bourse d'excellence. Je n'oublierai pas de citer et de remercier l'Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (**INAF**) de l'université de Laval et le regroupement **FODAR** pour les bourses de présentation que j'ai bénéficié tout au long de cette thèse. Tout ceci n'aurait pas été possible sans la bourse de mobilité scientifique et universitaire de l'Agence Universitaire de la Francophonie (**AUF**). Merci à tous !

Mes derniers remerciements vont à l'endroit de ma famille et mes amis. Je ne saurai trouver les mots juste pour dire merci à **mes parents Jacqueline et Maurice Paka** pour l'éducation, les encouragements et les nombreuses prières. À vous mes frères et sœurs

ainées ainsi que leurs familles respectives : **Jean-Guy, Myriam et leurs familles**, mes cadets **Merlin, Wilson, Judith, Linda, Carine, Ruth, Nelly, Junior, Joyce et Franck** pour avoir partagé virtuellement ses moments avec moi. À vous aussi, **Lestlie Laure et Yoann Cecilien**, je vous aime! Merci aux familles **Nouboussi, Nganou, Dongmo, Djokeng, Nzoghon, Ouojemwa**. Les amis et familles suivantes ont joué un rôle important tout au long de ses années : **Dongmo, Tuekam, Mbiakoup, Mingaha, Feulefack, Chimi, Lobe, Georges, Aline, Jonathan, Jerry, Steve, Aurélie, Jeffrey, Emery**. Je vous dis merci d'avoir été là pour moi !

RÉSUMÉ

Cette dernière décennie a été marquée par de nombreux efforts déployés dans la recherche des médicaments pour les maladies du système nerveux central (SNC) comme la maladie d'Alzheimer (MA). L'accumulation des radicaux libres au cours du vieillissement génère un stress oxydatif qui pourrait perturber l'intégrité et induire la mortalité des neurones. Le stress oxydatif est d'ailleurs cité comme un événement précoce dans l'étiologie de cette maladie. Afin de minimiser les dommages liés au stress oxydatif, une des stratégies consiste à administrer des composés antioxydants tel le curcumin, connu pour ses nombreux effets bénéfiques, notamment son activité antioxydante, mais aussi pour son activité anti-inflammatoire, anti-amyloïdogénique, de même que son potentiel d'anti-hyperphosphorylation de la protéine Tau sous des modèles cellulaires et animaux. Cependant, les résultats obtenus en clinique montrent une faible efficacité qui s'expliquerait par sa forte hydrophobicité, ce qui limite sa biodisponibilité orale. Plusieurs solutions ont été proposées, notamment l'utilisation de la nanotechnologie.

Dans cet élan, notre équipe travaille à développer des nanoparticules polymères (NPs) encapsulant des molécules actives à partir de polymères biocompatibles et biodégradables nommés poly (acide lactique-co-glycolique) (PLGA) pour des applications dans la MA. La première partie de ce projet a consisté à étudier l'effet de la composition matricielle, notamment le ratio acide lactique : acide glycolique (L:G) sur les propriétés physicochimiques et neuroprotectrices des NPs de type PLGA chargées de curcumin (NPs-Cur), un composé prometteur dans la prise en charge de la MA. Cependant, les défis actuels en nano-neuropharmacologie se résument en l'utilisation de nanovecteurs pour optimiser l'administration des principes actifs dans les cellules du cerveau. Nous nous sommes proposés dans la suite de ce projet de modifier la surface des NPs-Cur avec un ligand peptidique, le glutathion (GSH), afin d'étudier son effet sur les mécanismes d'internalisation neuronale des NPs-Cur. Les formulations chargées de

curcumin ont été préparées par nanopréciipitation et puis leur modification au GSH (GSH-NPs-Cur) a été réalisée à l'aide de la réaction thiol-maléimide. Après la caractérisation des NPs ainsi que leur modification au GSH, les mécanismes d'internalisation au niveau neuronal ont été investigués en utilisant différents inhibiteurs d'endocytose.

Nos résultats montrent un effet de la composition polymérique de la matrice notamment du ratio L:G (65:35 et 50:50 respectivement pour les formulations NPs-Cur 65:35 et NPs-Cur 50:50) sur les propriétés physicochimiques des formulations ainsi que sur l'activité biologique. Nous avons montré que l'utilisation du polymère 50:50 permet d'obtenir une meilleure réponse sur les mécanismes neuroprotecteurs du curcumin contre le stress oxydatif, un marqueur précoce de la MA. Plus précisément, nos résultats démontrent que les NPs-Cur 50:50 sont capables d'empêcher l'induction de la voie de signalisation antioxydante *Kelch-like ech-associating protein 1- Nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Keap1-Nrf2)*, d'inhiber l'activation de la voie pro-inflammatoire *Nuclear factor-κB (NF-κB)* et la phosphorylation de la protéine *Tau* en présence d'H₂O₂. On note aussi une normalisation de l'expression de certains gènes neuroprotecteurs et sensibles au potentiel redox cellulaire. Ces mécanismes étant tous impliqués dans la physiopathologie de la MA. L'utilisation d'une matrice à base de type PLGA 50:50 serait le meilleur compromis entre la composition matricielle et l'activité biologique lors de l'encapsulation des principes actifs hydrophobes avec un coefficient de partage octanol/eau proche de celui curcumin (LogP apparent de 3.2).

Afin de progresser dans la mise en place d'un système nanoparticulaire modifié par un ligand, la réaction thiol-maléimide a été utilisée pour le couplage du GSH à la surface des NPs fonctionnalisées au maléimide. Nous avons par la suite caractérisé les formulations modifiées au GSH vide (GSH-NPs) et chargées de curcumin (GSH-NPs-Cur) par la détermination de leurs propriétés physicochimiques, mesuré l'effet du GSH sur les mécanismes d'internalisation, puis évalué leurs propriétés neuroprotectrices. Nos résultats montrent que la modification de surface augmente l'internalisation neuronale des formulations. De plus, nous avons montré que la présence du GSH ne

modifie pas les propriétés physicochimiques des NPs-Cur. On note un effet sur les mécanismes d'internalisation car la présence du GSH empêche la micropinocytose au profit de l'endocytose dépendante des cavéoles et des clathrines. Il est clair que la spécificité de ces mécanismes en fonction du type cellulaire reste à élaborer davantage. Cette approche pourrait aboutir à la mise en place d'une stratégie intéressante applicable dans le traitement des pathologies affectant le cerveau comme la MA.

Mots-clés : nanoparticules polymères (NPs), acide *poly (lactique-co-glycolique)*, curcumin, ratio acide lactique : acide glycolique, glutathion, formulations modifiées, cellules neuronales, neuroprotection.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is an age-related neurodegenerative disease affecting more than 35 million people worldwide. With several overlapping pathways, there is no efficient treatment for AD. The implication of oxidative stress in the onset of neurodegenerative diseases such as AD has been well established. Oxidative stress is described as an early event since marker of oxidative stress such as acrolein, a lipid peroxidation by-product; specifically accumulates in vulnerable regions of mild cognitive impairment and preclinical AD patients. Several neuroprotective agents with promising therapeutic potential, such as curcumin, have a low brain distribution due to their poor oral bioavailability. Poly (Lactide-co-Glycolide) (PLGA) copolymers can display various physicochemical and degradation characteristics for controlled release applications into the central nervous system.

In this thesis, we firstly highlighted the importance of polymer composition (lactic acid: glycolic acid of 50:50 and 65:35 respectively) in the physicochemical properties and biological fate of the nanodrug delivery systems. Herein, we demonstrated that curcumin-encapsulated PLGA 50:50 nanoparticles (NPs-Cur 50:50) is able not only to prevent the phosphorylation of Akt and Tau proteins in SK-N-SH cells induced by H₂O₂, but also displays higher anti-inflammatory and antioxidant activities than free curcumin. Secondly, we studied the effects of the PLGA matrix composition on the expression of some key antioxidant- and neuroprotective-related genes. We found that both NPs-Cur matrices are more efficient than free curcumin to prevent the induction of these genes. Higher uptake was found with NPs-Cur 50:50 than NPs-Cur 65:35 or free curcumin. One major challenge in the field of nanotherapeutics is to optimise the delivery of cargo to targeted cells. For this purpose, we synthesized and characterised glutathione-functionalized PLGA-nanoparticles (GSH-NPs) loaded with curcumin (GSH-NPs-Cur). After characterization, we found that GSH-functionalization did not affect physicochemical properties of our formulations. *In vitro*, we found no toxicity and

furthermore a better neuroprotective property against oxidative stress induced with acrolein. Higher neuronal uptake was reported with GSH-NPs-Cur than free curcumin. Interestingly, we found that GSH-functionalization modifies the route of internalisation from macropinocytosis to safer endocytosis uptake.

These data highlight the importance of polymer composition and surface modification in the therapeutic properties of the nanodrug delivery system

Keywords : nanoparticles, poly (lactide -co- glycolide), lactide :glycolide ratio, glutathione-functionalization, curcumin, neuronal cells, neuroprotection.

LISTE DES ARTICLES DANS CETTE THÈSE

Articles de recherche inclus dans cette thèse

- ✚ **DJIOKENG P.G.**, Doggui S., Ramassamy C., et al., (2015). Neuronal Uptake and Neuroprotective Properties of Curcumin-Loaded Nanoparticles on SK-N-SH Cell Line: Role of Poly(lactide-co-glycolide) Polymeric Matrix Composition. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00611
- ✚ **DJIOKENG P.G.** et Ramassamy C., (2016). 3.3 Optimization of curcumin loaded-PEG-PLGA nanoparticles by GSH functionalization. Investigation of the internalization pathway in neuronal cells. Just accepted. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00738

Autres contributions en Annexe

- ✚ Doggui S. et Belkacemi A., **DJIOKENG P.G.**, et al., (2013). "Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways." Mol Nutr Food Res **57**(9): 1660-1670.
- ✚ Rabanel J.M. et Lefaiivre J., **DJIOKENG P.G. et al.**, (2015). " Effect of polymer architecture on Curcumin 1 encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: toward a drug delivery nano-platform to the CNS." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Volume 96, October 2015, Pages 409–420.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	II
RESUME	V
ABSTRACT	VIII
LISTE DES ARTICLES DANS CETTE THÈSE	X
ARTICLES DE RECHERCHE INCLUS DANS CETTE THESE	X
AUTRES CONTRIBUTIONS EN ANNEXE	X
SOMMAIRE	XI
LISTE DES ABREVIATIONS	XIV
TABLE DES FIGURES	XVII
TABLE DES TABLEAUX	XVIII
1 CHAPITRE 1 :	1
REVUE DE LITTERATURE	1
1.1 LA MALADIE D'ALZHEIMER	1
1.1.1 <i>Généralité sur la MA</i>	1
1.1.2 <i>Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer</i>	1
1.1.3 <i>Le stress oxydatif et la MA</i>	3
1.1.4 <i>Les traitements actuels et leurs limitations</i>	5
1.1.5 <i>Rôle des antioxydants : le glutathion et la maladie d'Alzheimer</i>	5
1.1.6 <i>Rôle des antioxydants : les polyphénols, le cas du curcumin</i>	7
1.2 LES NANOPARTICULES: DEFINITIONS	10
1.2.1 <i>Les nanoparticules de première génération</i>	11
1.2.2 <i>Les nanoparticules de deuxième génération</i>	14
1.2.3 <i>Les nanoparticules de troisième génération</i>	16

1.2.4	<i>Le marché des nanoparticules</i>	17
1.3	APPLICATION DES NANOPARTICULES COMME OUTIL DANS LE TRAITEMENT DES MNDs	17
1.3.1	<i>La BHE : l'obstacle à franchir par les formulations à visée cérébrale</i>	18
1.3.2	<i>Le transport des molécules à travers la BHE</i>	19
1.3.3	<i>Étude de la perméabilité à travers la BHE</i>	20
1.3.4	<i>Les ligands ciblant le SNC</i>	23
1.3.5	<i>Le glutathion comme agent de ciblage</i>	26
1.4	PREPARATION DES NANOPARTICULES MODIFIEES PAR DES LIGANDS	27
1.4.1	<i>Méthodes de préparation des nanoparticules polymères</i>	27
1.4.2	<i>Techniques de conjugaison</i>	28
1.4.3	<i>Technique de caractérisation des nanoparticules polymères modifiées</i>	31
1.5	INTERNALISATION DES NANOPARTICULES POLYMERES	33
1.5.1	<i>La Phagocytose</i>	36
1.5.2	<i>La Pinocytose</i>	37
1.5.3	<i>Endocytose dépendante des cavéoles</i>	37
1.5.4	<i>Endocytose dépendantes des clathrines</i>	38
1.5.5	<i>Endocytose indépendante des clathrines et des cavéoles</i>	39
	HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	41
	OBJECTIF GENERAL	43
	OBJECTIFS SPECIFIQUES	43
2	CHAPITRE 2 :	45
	ARTICLE 1	45
	NEURONAL UPTAKE AND NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF CURCUMIN-LOADED NANOPARTICLES ON SK-N-SH CELL LINE: ROLE OF POLY(LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) POLYMERIC MATRIX COMPOSITION	45
2.1	RESUME DE L'ARTICLE 1	46
2.2	CONTRIBUTION DE L'ETUDIANT	47

2.3	NEURONAL UPTAKE AND NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF CURCUMIN-LOADED NANOPARTICLES ON SK-N-SH CELL LINE: ROLE OF POLY(LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) POLYMERIC MATRIX COMPOSITION.	48
2.4	CONCLUSION DE L'ARTICLE 1.....	49
3	CHAPITRE 3 :	51
	ARTICLE 2.....	51
	OPTIMIZATION OF CURCUMIN LOADED-PEG-PLGA NANOPARTICLES BY GSH FUNCTIONALIZATION. INVESTIGATION OF THE NEURONAL INTERNALIZATION PATHWAY	51
3.1	RESUME DE L'ARTICLE 2	52
3.2	CONTRIBUTION DE L'ETUDIANT A L'ARTICLE 2	53
3.3	OPTIMIZATION OF CURCUMIN LOADED-PEG-PLGA NANOPARTICLES BY GSH FUNCTIONALIZATION. INVESTIGATION OF THE INTERNALIZATION PATHWAY IN NEURONAL CELLS.	54
3.4	CONCLUSION DE L'ARTICLE 2.....	64
4	CHAPITRE 4 :	66
	DISCUSSION GENERALE	66
4.1	PREPARATION ET CONJUGAISON DES NPs.....	68
4.2	LA CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE	71
4.3	ÉTUDE DES PROPRIETES NEUROPROTECTRICES.....	75
4.4	INTERNALISATION ET MECANISMES D'INTERNALISATION CELLULAIRE DES FORMULATIONS	77
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	81
5	ANNEXES	83
5.1	AUTRES CONTRIBUTIONS	83
	5.1.1 Annexe 1 : Article 3	83
	5.1.2 Annexe 2 : Article 4	84
	RÉFÉRENCES.....	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A β :	Amyloïde β
Ach:	Acétylcholine
AD :	Alzheimer disease
AICD:	<i>Amyloid precursor protein intracellular domain</i>
ADN :	Acide désoxyribonucléique
Akt :	Protein kinase B
ApoE :	Apolipoprotéine E
APP :	Protéine précurseur de l'Amyloïde
BACE-1 :	Sécretase- β
BBB :	Blood brain barrier
BHE:	Barrière hémato-encéphalique
CNS :	Central nervous system
DCF-DA:	2,7-dichlorofluoresceine diacétate
DLS :	Dynamic light scattering
DNF:	Dégénérescence neurofibrillaire
DPPH :	2,2 diphenyl 1 picrylhydrazyl
EDE :	Émulsion-diffusion-évaporation
EE :	Éfficacité d'encapsulation
EROs :	Espèces réactives oxygénées
FTIR :	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>

GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GPx : Glutathion Peroxydase

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion réduit

GSK 3 : Glycogène synthase kinase 3

GSSG : Glutathion-disulfure

GST: Glutathion S Transferase

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

HPLC: *High pressure liquid chromatographie*

HNE: 4-Hydroxynonéanal

I.V: Intraveineux

Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*

LDH : Lactate déshydrogénase

LDL : Lipoprotéine de basse densité

LDLR : Famille des récepteurs des LDLs

LogP : Coefficient de lipophilicité

MA : Maladie d'Alzheimer

MET : Microscopie électronique à transmission (TEM)

NF-KB : Facteur nucléaire Kappa-B

Nrf2: Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor 2

NPs: Nanoparticules polymères

PACA: Poly (alkycyanocrylate)

PBCA: Polybutyl (cyanocrylate)

PBS:	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCA:	Poly (cyanocrylate)
PEG:	Polyethylene glycol
PCL:	Poly (ε Caproactone)
P-gp :	P-glycoprotéine
PLGA:	Poly (lactic-co-glycolic) acid
PS :	Préséniline
ROP :	Ring opening polymerization
SOD :	Superoxyde dismutase
SNC :	Système nerveux central
TEER:	Résistance électrique transendothéliale
TRX :	Thioredoxine

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : VOIES PROTEOLYTIQUES DE LA PROTEINE PRECURSEUR DE L'AB.....	2
FIGURE 2 : STRUCTURE CHIMIQUE DU GSH.....	6
FIGURE 3. STRUCTURES CHIMIQUES DES CURCUMANOÏDS ET LEURS GROUPEMENTS REACTIFS (BELKACEMI <i>ET AL.</i> , 2011).....	9
FIGURE 4. MECANISME DE SYNTHESE UTILISANT LA POLYMERISATION PAR OUVERTURE DE CYCLE (ROP) ET HYDROLYSE EN MILIEU ACIDE DU PLGA.....	13
FIGURE 5. ILLUSTRATION DES SYSTEMES NANOPARTICULAIRES DE DEUXIEME GENERATION, LE POLYMERE PEG ASSURANT LA FURTIVITE.	15
FIGURE 6: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE SELON (STRAZIELLE <i>ET AL.</i> , 2005).....	19
FIGURE 7 : CONJUGAISON DIRECTE UTILISANT LA REACTION MALEIMIDE ET THIOL ; STRUCTURE DU POLYETHYLENE GLYCOL (PEG)	30
FIGURE 8 CLASSIFICATION DES DIFFERENTS PROCESSUS D'ENDOCYTOSE.....	34

1 TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : QUELQUES MODELES EXPERIMENTAUX UTILISES POUR L'ETUDE DE LA PERMEABILITE A TRAVERS LA BHE.....	21
TABLEAU 2 : QUELQUES EXEMPLES DE LIGANDS CIBLANT LE CNS UTILISES POUR LA MODIFICATION SURFACIQUE DES NPS DE TYPE PLGA.....	25

1 CHAPITRE 1 :

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 La maladie d'Alzheimer

1.1.1 Généralité sur la MA

La MA est un problème majeur de santé publique puisqu'elle est à l'origine de plus de 50 % des cas de démence. Elle constitue un handicap sévère de par une incidence annuelle de 7,5 patients pour 1 000 personnes dans le monde (Joshi *et al.*, 2010; Reitz *et al.*, 2011). Au vue du pourcentage sans cesse croissant de la tranche des personnes âgées de plus de 65 ans, une augmentation de la prévalence de la MA est prévisible au fil du temps (Ferri *et al.*, 2005). La MA existe sous deux formes : la forme précoce ou familiale qui apparait typiquement avant l'âge de 65 ans et représente seulement moins de 5% de la totalité des cas enregistrés. Il a été montré que la présence de mutations sur les gènes préséniline 1 (PS1), préséniline 2 (PS2) ou de la protéine précurseur du peptide d'amyloïde (PPA) favorise la production des formes d'amyloïde β ($A\beta$) trouvées dans les plaques séniles (PS) (Vinters *et al.*, 1988). La forme tardive ou sporadique de la MA représente quant à elle plus de 90% des cas, le seul marqueur génétique identifié étant la présence de l'allèle ApoE4.

1.1.2 Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

De nombreux travaux ont été réalisés dans le but d'élucider l'étiologie de la MA. L'étude *post mortem* du cerveau des patients atteints de la MA a permis d'y détecter des PS et des dégénérescences neurofibrillaires (DNFs) au niveau de l'hippocampe et du cortex. Les fragments $A\beta_{1-42}$ trouvés dans les PS proviennent du clivage de la PPA suivant la voie amyloïdogénique qui est initiée par la β sécrétase. Cette coupure à partir

du domaine N-terminal du PPA libère le fragment soluble sAPP- β et le fragment membranaire β -CTF. Ce dernier subira lui aussi une protéolyse par la γ sécrétase avec libération du domaine intracellulaire de la PPA (AICD) et des fragments A β 1-40 ou A β 1-42 qui s'accumulent pour former les PS (Nunan & Small, 2000; Tabaton & Tamagno, 2007). La voie non amyloïdogénique, et donc non toxique, est catalysée par l' α sécrétase qui assure le premier clivage libérant le fragment soluble (sAPP- α). La séquence membranaire résultante (α -CTF) est clivée par la γ sécrétase pour excréter le peptide p3 de 3kDa et l'AICD (figure 1).

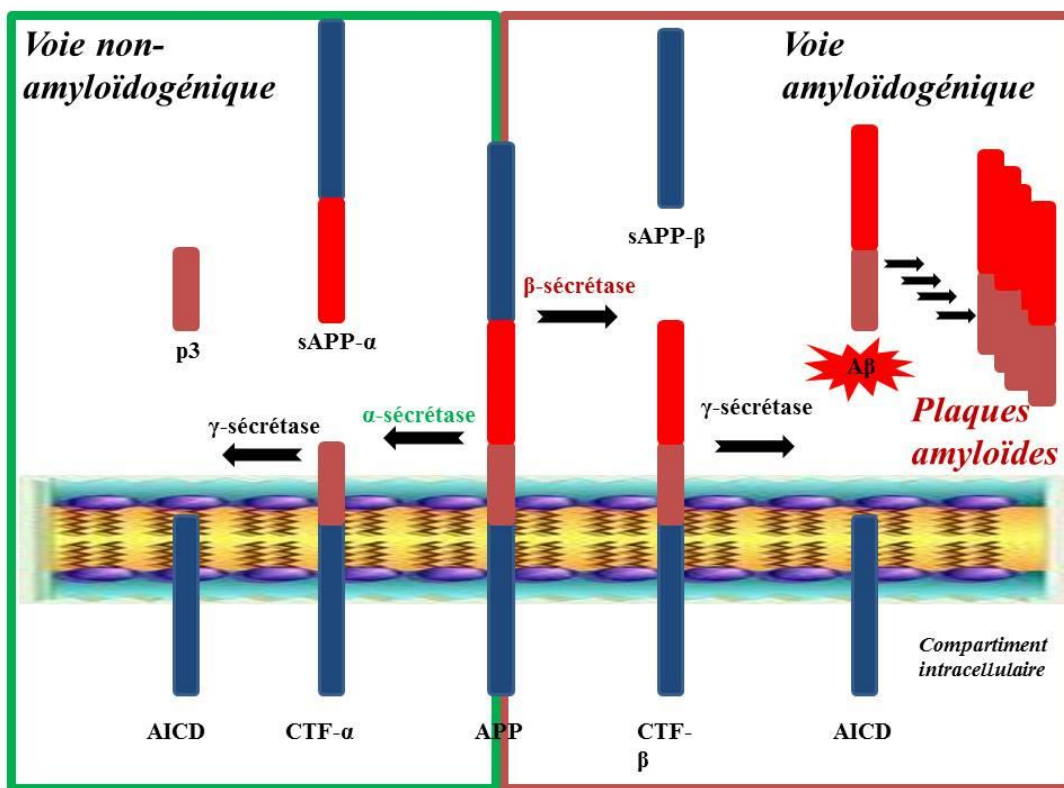


Figure 1 : Voies protéolytiques de la protéine précurseur de l'A β

Plusieurs évidences scientifiques expliquent la vulnérabilité du cerveau au stress oxydatif au cours du vieillissement et des pathologies du SNC. Notamment, le cerveau contient des niveaux élevés d'acides gras insaturés, particulièrement vulnérables à

l'oxydation; les plus fortes concentrations de métaux de transition comme les ions ferreux (Fe^{2+}) sont retrouvées dans le cerveau. Plus de 20% de l'oxygène consommé par l'organisme est utilisé par le cerveau. Aussi, les niveaux d'antioxydants clés dans le cerveau, comme le glutathion et la vitamine C, diminueraient drastiquement avec l'âge (Emir *et al.*, 2011; Halliwell, 1999).

Les études sur le cerveau des patients de la MA révèlent aussi la présence des DNFs. Elles résultent de la dégénérescence des extensions neuritiques des neurones due à une hyperphosphorylation des protéines Tau, une petite protéine axonale qui permet la stabilité des microtubules. La phosphorylation de Tau est régulée par la balance entre différentes kinases (GSK3 et CDK5) et phosphatases (PPI et PP2A). Elle cause l'enchevêtrement des microtubules perturbant le transport axonal et les fonctions synaptiques.

Des études biochimiques du cerveau des patients de la MA ont montré un déficit de l'acetylcholine transférase qui est l'enzyme assurant la synthèse de l'acétylcholine (ACh) (Davies & Maloney, 1976; Perry *et al.*, 1977) avec pour conséquence une baisse de la production de l'ACh (Nilsson *et al.*, 1986). L'ACh est un neurotransmetteur qui joue un rôle primordial dans le SNC de par son implication dans la mémoire et dans l'apprentissage, mais aussi dans le système nerveux périphérique notamment sur l'activité musculaire et les fonctions végétatives. Il a été montré que la mort des neurones cholinergiques contribue significativement à la détérioration des fonctions cognitives chez les patients atteints de la MA (Francis *et al.*, 1999). Les traitements proposés actuellement s'appuient sur cette hypothèse.

1.1.3 Le stress oxydatif et la MA

De nombreuses évidences associent la neurotoxicité de l'A β à sa capacité à induire le stress oxydatif, car elle contribue au dysfonctionnement mitochondrial et pourrait induire une perturbation de la phosphorylation oxydative aboutissant à une

surproduction des espèces réactives oxygénées (EROs) (Tillement *et al.*, 2011). Il a également été montré que l'A β serait un inducteur de la peroxydation lipidique (Dikalov *et al.*, 2004; Yoshiike *et al.*, 2001), mais aussi serait capable d'induire spontanément la production des EROs en présence de faibles concentrations de métaux. Toutefois, il en résulte une surproduction d'EROs qui perturbe l'équilibre redox cellulaire; ceci entraîne une accumulation des dommages oxydatifs sur les lipides, les protéines et les acides nucléiques, puis à la mort cellulaire par apoptose.

Dans le cas de la MA, le stress oxydatif semble précéder la formation des plaques amyloïdes chez les modèles animaux. Par exemple, sur le modèle triple transgénique, le 3xTg-AD, caractérisé par la mutation humaine suédoise de l'APP, la mutation M146V de la PS1 et la mutation P301L de la protéine tau, on note une apparition des premiers marqueurs du stress oxydatif dès l'âge de 3 mois. L'apparition des dégénérescences neurofibrillaires survient autour de 12 mois. Sachant que le dysfonctionnement apparaît autour de 9-10 mois chez le Tg2576 et à 4 mois chez le 3x-TgAD), tout ceci placerait le stress oxydatif comme un évènement précoce dans la MA (Belkacemi & Ramassamy, 2012). De plus, une panoplie d'études montre une augmentation du nombre de mutations et de sites d'oxydation sur l'ADN mitochondrial (Gabbita *et al.*, 1998) dans le cerveau de patients atteints de la MA (Coskun *et al.*, 2004). Il en est de même pour l'activité des enzymes antioxydantes par exemple, la SOD et la catalase qui est faible dans le cortex des patients atteints de la MA (Marcus *et al.*, 1998).

1.1.4 Les traitements actuels et leurs limitations

De nombreuses études ont permis la mise en place de diverses stratégies pour le traitement de la MA, mais jusqu'à nos jours aucun traitement efficace n'existe. Les traitements proposés contre la MA permettent l'amélioration des symptômes sans traiter son étiologie. Par exemple, la tacrine (9-amino-1, 2, 3,4-tetrahydroacridine), un inhibiteur réversible de l'acétylcholinestérase est capable d'interagir avec plusieurs cibles de la MA (Arslan & Laake, 1996; Chatellier & Lacomblez, 1990; Nordberg *et al.*, 1992; Sahni *et al.*, 2011). Bien qu'administrée quatre fois par jour, on note une faible distribution cérébrale liée à une élimination rapide dans la circulation sanguine et une forte action périphérique (une hyperstimulation du système cholinergique périphérique, de troubles de fonctions cardiaques, une forte hépatotoxicité, troubles du tractus gastro-intestinal; douleur abdominale, nausée, vomissement, diarrhée) qui a rapidement limité son utilisation (Nordberg & Svensson, 1998). De ce fait, une deuxième génération d'inhibiteur de l'acétylcholine estérase (donepezil, rivastigmine ou galantamine) a été proposée, mais du fait de leur courte demi-vie et des comorbidités associées (Seitz *et al.*, 2009), leur utilité en clinique reste limitée. Une autre classe de médicaments utilisée dans le traitement de la MA est celle des antagonistes non-compétitifs des récepteurs N-méthyle-D-aspartate, à l'instar de la mémantine, proposée dans la prise en charge des formes modérées ou sévères de la MA.

1.1.5 Rôle des antioxydants : le glutathion et la maladie d'Alzheimer

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cystéinyl-glycine) de 307g/mol (voir figure 2), le composé thiolé le plus important chez les humains et dans les plantes possédant une puissante activité antioxydante (Sies, 1999). La concentration de GSH cellulaire est fonction du compartiment. Par exemple, elle se situe entre 1 et 11 mM dans le cytosol, de 5 à 11 mM dans les mitochondries et de 3 à 15 mM dans le noyau

((Valko *et al.*, 2007)). Dans le cerveau, on retrouve de faibles concentrations de GSH, la moyenne approximative se situant entre 1 à 3 mM (Dringen, 2000).

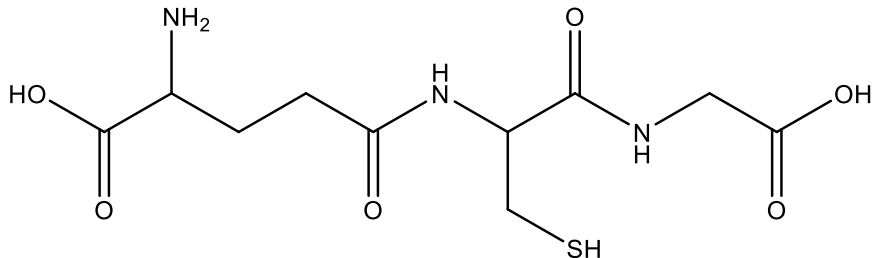


Figure 2 : Structure chimique du GSH

Dans le cerveau, le GSH est l'antioxydant majoritaire. Il réagit avec les EROs et les composés nucléophiles comme les sous-produits de la peroxydation lipidiques notamment le 4-hydroxynonéal (HNE) et l'acroléine (Lash 2009, Zhu, Gallogly et al. 2009, Dang, Arseneault et al. 2010). Cette réaction, catalysée par la glutathion peroxydase, conduit à la formation du GSH oxydé (GSSG) qui à son tour sera régénéré par la glutathion réductase (GR). La glutathion s-transférase catalyse aussi la réaction entre le GSH et les composés nucléophiles telles que l'HNE et l'acroléine. Dans l'hippocampe, il a été montré que l'HNE se fixerait de manière covalente sur la GST, la rendant ainsi inactive (Sultana & Butterfield, 2004; Sultana *et al.*, 2009). Une autre enzyme impliquée dans le métabolisme du GSH est la glutaredoxine (Grx). La Grx est une thiol transférase qui assure la réversibilité de la glutathionylation, un des processus de modifications post-traductionnelles des protéines (Chrestensen *et al.*, 2000). Environ 10 à 15 % du GSH cellulaire est synthétisé dans le cytoplasme et se retrouve dans les mitochondries où il assure les fonctions de chélateur des EROs et d'agents réducteurs de certains systèmes antioxydants, protégeant ainsi les cellules de l'apoptose (Mari *et al.*, 2009). La Grx et la Trx sont des systèmes clés dans le maintien de l'environnement redox cellulaire; ce qui confère ainsi une protection contre le stress cellulaire. Akterin et ses collaborateurs ont montré une augmentation de l'expression de l'ARNm de la GRX

dans le cerveau des patients atteints de la MA comme mécanisme compensatoire de la réduction de la TRX (Akterin *et al.*, 2006).

1.1.6 Rôle des antioxydants : les polyphénols, le cas du curcumin

Au vue des études épidémiologiques et de la physiopathologie de la MA, de nombreux chercheurs se sont orientés vers les plantes et les produits naturels tels que le *Gingko biloba*, le curcumin et les catéchines comme agents antioxydants et neuroprotecteurs (Ramassamy, 2006). Selon ces études, la consommation de produits naturels riches en molécules antioxydantes induit une pléthore d'effets bénéfiques, et de ce fait, constitue une source prometteuse dans la neuroprotection (Le Bars *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2008). Dans ce scénario, certains composés dérivés des plantes médicinales jouent un rôle primordial dans la recherche et le développement des médicaments. A titre d'exemple, une forte corrélation positive est observée entre la consommation des aliments riches en composés polyphénoliques et la prévention de certaines MNDs notamment la MA (Lu *et al.*, 2006). L'une des molécules antioxydantes les plus citées et le plus étudiées est le curcumin (figure 3), avec un potentiel neuroprotecteur *in vitro* établi. Il a même été cité comme étant le plus actif parmi 214 autres molécules naturelles réduisant l'inhibition de la fibrillation de l'A β (Kim *et al.*, 2005).

Cependant, que ce soit pour le curcumin ou pour la majorité des métabolites secondaires des plantes (épigallocatechine gallate pour EGCG, resveratrol et catéchine), la faible biodisponibilité due à leur faible hydrosolubilité, leur faible absorption et surtout leur forte dégradation gastro-intestinale sont autant de facteurs qui réduisent leur efficacité thérapeutique. De plus, chez des souris recevant par voie intrapéritonéale 0,1 g/kg de curcumin on a pu détecter après une heure 177,04 $\mu\text{g/mL}$, 26,06 $\mu\text{g/mL}$, 26,90 $\mu\text{g/mL}$, 7,57 $\mu\text{g/mL}$, respectivement, dans l'intestin, la rate, le foie et les reins, contrairement à seulement quelques traces dans le cerveau (0,41 $\mu\text{g/mL}$). De nombreux travaux ont été publiés sur l'encapsulation du curcumin pour prévenir la

dégradation gastrique utilisant plusieurs types de NPs comme le m-PEG-palmitate (Sahu *et al.*, 2008), l'acide polyacrylique (Mulik *et al.*, 2010a), les nanoparticules solides de lipides (Mulik *et al.*, 2010b) ou encore du PLGA (Doggui *et al.*, 2012). On observe certes une amélioration des propriétés biologiques et de l'internalisation mais une distribution non spécifique demeure. Pour permettre une administration ciblée et spécifique des médicaments à travers la BHE, une panoplie de méthodes a été proposée. Celle impliquant l'ouverture osmotique de cette barrière (Rapoport, 1996), l'utilisation de molécules bioactives comme l'histamine, la sérotonine, la substance P et les métalloprotéinases (Abbott & Revest, 1991), ou encore le développement des systèmes nanoparticulaires dotés de molécules de ciblage dans le domaine de la chimie médicinale (Roney *et al.*, 2005).

La capacité neuroprotectrice du curcumin s'explique en grande partie par sa puissante capacité antioxydante. Sur des cellules exposées à l'hémine, la forme oxydée et toxique de l'hème, Gonzalez-Reyes et ses collaborateurs ont montré que le curcumin pourrait induire une augmentation des niveaux d'expression neuronale de l'hème oxygénase (HO-1), une préservation du taux de glutathion réduit ainsi qu'une activation des protéines antioxydantes comme la glutathione-S-transferase, la glutathione réductase, et la superoxyde dismutase toutes régulées par le facteur de transcription Nrf2 (Gonzalez-Reyes *et al.*, 2013). Nos travaux ont récemment ressorti l'effet du curcumin sur la normalisation des niveaux de ERO, la restauration de l'activité des facteurs de transcription NF- κ B et Nrf2 dans les cellules SK-N-SH stressées par l'acroléine (Doggui *et al.*, 2013).

Plusieurs travaux ont également démontré que le curcumin pourrait être un agent thérapeutique prometteur dans la MA. Ceci s'explique par son effet bénéfique sur deux acteurs clés impliqués dans la physiopathologie de la MA à savoir l'A β et la protéine tau. Par exemple, il a été montré que le curcumin pourrait inhiber la fibrillation de l'A β , tout en facilitant la désintégration des fibrilles d'A β préformées (Ono *et al.*, 2004). De plus, plusieurs études ont démontré la capacité du curcumin à inhiber l'hyperphosphorylation de la protéine Tau sur des modèles cellulaires (Huang *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2008). En

préclinique, une diète contenant 500 ppm de curcumine pendant 5 mois réduit le niveau de l'A β soluble et l'étendue des plaques chez les souris (Yang *et al.*, 2005). De même, le curcumine est capable de rétablir le déficit synaptique et comportemental chez des souris portant une mutation de la protéine Tau (Ma *et al.*, 2013).

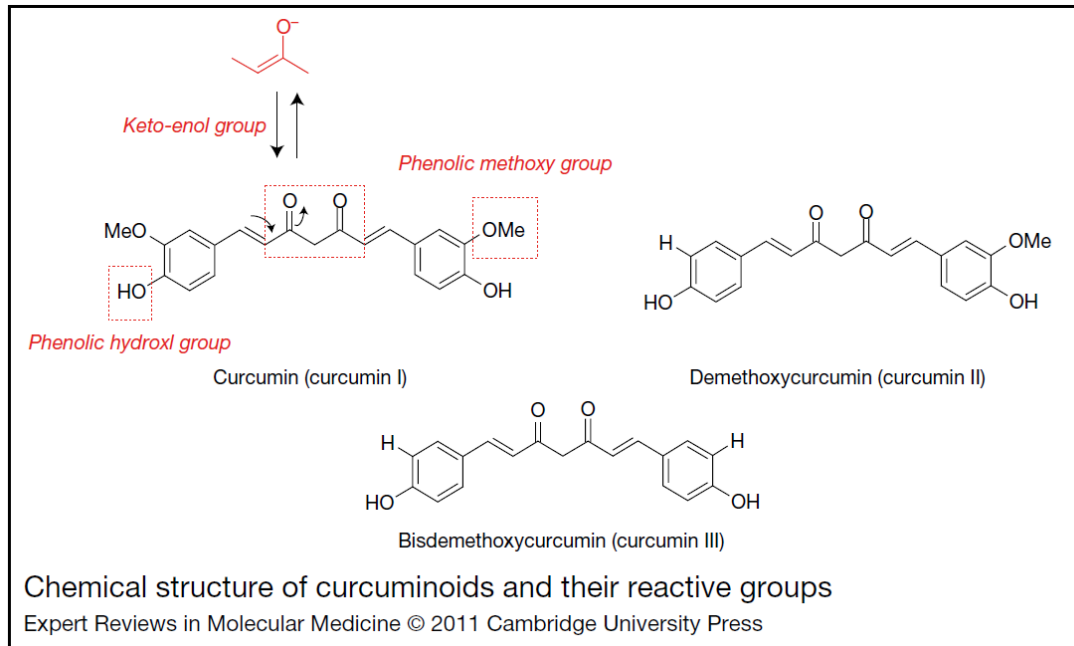


Figure 3. Structures chimiques des curcumanoïdes et leurs groupements réactifs (Belkacemi *et al.*, 2011).

En clinique, plusieurs études ont montré une amélioration des fonctions cognitives chez des individus consommant occasionnellement le curcumine (Ng *et al.*, 2006). Chez des sujets atteints de la MA, les patients recevant 4 g de curcumine par jour pendant 6 mois ont montré une augmentation de la concentration d'A β dans la circulation (Baum *et al.*, 2008). Ceci traduisait une action bénéfique du curcumine dans la réduction des niveaux d'A β , notamment du cerveau vers les périphéries. Cependant, une étude de phase II menée en Californie sur des patients au stade moyen ou modéré de la MA a montré aucun effet sur les fonctions cognitives et les niveaux de la protéine Tau (Ringman *et al.*, 2008). De nombreux composés naturels, ainsi que de principes actifs applicables dans le traitement des MNDs présentent une efficacité limitée à cause de

leur faible biodisponibilité orale étant donné leur forte hydrophobicité (Scalbert & Williamson, 2000). Plusieurs stratégies ont été utilisées pour augmenter l'efficacité du curcumin notamment l'utilisation des *solubility enhancer* comme la bioperine, dans l'espoir d'augmenter sa biodisponibilité. L'utilisation des nanoparticules a aussi été prouvée comme un moyen efficace de protection des principes actifs.

1.2 Les nanoparticules: Définitions

Étymologiquement, le préfixe «nano» vient du grec «nânos» qui signifie «nain». Les nanotechnologies regroupent l'ensemble des sciences qui s'attèlent à la conception, la caractérisation et/ou l'utilisation des structures de tailles nanométriques (de 1 à quelques centaines de nanomètres) pour différentes applications (Gref *et al.*, 1994; Parveen *et al.*, 2012). En raison de leurs caractéristiques physicochimiques comme la taille, les caractéristiques de surface, la stabilité dans les milieux biologiques, les NPs se sont imposées au fil du temps comme étant une solution prometteuse pour l'administration de composés bioactifs dans l'organisme. Ainsi, les NPs permettent de protéger le principe actif, réduire la dose, minimiser les effets secondaires indésirables et la fréquence d'administration du médicament.

Pour aboutir à une application en clinique comme transporteur de principes actifs sous la forme injectable, certaines propriétés sont préférables dans le cas de l'utilisation des NPs à visée cérébrale:

- Être non toxique, biodégradable et biocompatible : de ce fait, sa composition chimique devra permettre son élimination ultérieure.
- Avoir une taille idéale en fonction des applications : par exemple, pour l'administration des formulations dans le cerveau, la taille oscille généralement entre 80-300 nm et permettant le transport d'une quantité adéquate de principes actifs pour une action pharmacologique (U. Schroeder *et al.*, 1998).

- Avoir la capacité de traverser le tractus gastro-intestinal et d'autres barrières biologiques (la barrière de l'endothélium vasculaire, la BHE ainsi que les membranes cellulaire et nucléaire).
- Être stable dans le sang, tout en y augmentant son temps de circulation : Ceci augmente la probabilité pour le principe actif de rejoindre son site d'action. Il est donc important de contourner les processus d'opsonisation suite à l'interaction avec des opsonines, des protéines plasmatiques qui les vulnérabilisent à la dégradation par le système réticuloendothélial.
- Permettre la libération graduelle des composés dans le temps. Des systèmes modernes devront permettre une libération graduelle et spécifiée grâce à l'inclusion des liaisons réversibles en fonction du pH, de la température, de la force ionique ou du potentiel redox, augmentant ainsi leur biodisponibilité.
- Être de fabrication simple, reproductible et économique et permettre des conditions de stockage faciles.

1.2.1 Les nanoparticules de première génération

Afin d'augmenter la biodisponibilité des médicaments, les liposomes (vésicules constituées d'une bicouche lipidique) ont très vite été proposés comme outil de protection et de transport des composés actifs et thérapeutiques. Ils sont constitués d'une ou plusieurs couches lipidiques avec au cœur un réservoir aqueux et de tailles comprises entre 30 nm à quelques micromètres (Torchilin, 2006a; Torchilin, 2006b). Bien que non toxiques et biocompatibles, leur courte demi-vie de circulation (faible stabilité structurale) demeurent leurs principales limites (Amarnath Sharma, 1997).

D'autres types de nanoparticules ou systèmes de transport comme les micelles, les nanotubes de carbones, les dendrimères et les NPs sont cités pour l'administration des médicaments. Les NPs sont de plusieurs natures notamment organométallique, lipidique, squalénisée. Le polymère peut être d'origine naturelle comme les polysaccharides (le chitosane) ou alors synthétique comme le Poly (acide lactique), le

poly (ε-Caproactone) et le poly (alkyrcyanocrylates), le PLGA et bien d'autres (Hans & Lowman, 2002; Panyam & Labhasetwar, 2012). Les premières NPs ont été proposées par l'équipe du professeur Couvreur autour des années 1980 à partir du PACA (Couvreur *et al.*, 1980). Elles regroupent les nanosphères (où le principe actif est dispersé au sein de la matrice polymérique) et les nanocapsules (systèmes vésiculaires constitués du polymère renfermant la molécule).

Ainsi dans la première génération de NPs, plusieurs polymères sont utilisés pour la synthèse de ces nanoparticules : le chitosane, l'albumine, la gélatine et l'alginate de sodium, le PLGA et bien d'autres (Soppimath *et al.*, 2001). Du fait de leur biocompatibilité et de leur faible toxicité, le PLGA est largement utilisé comme excipient dans de nombreux médicaments approuvés par « la US Food and Drug Administration for Human Therapy ». Ceci fait de lui un polymère intéressant pour la préparation des formulations nanoparticulaires (Makadia & Siegel, 2011; Shive & Anderson, 1997).

Dans cette thèse, nous avons donc travaillé avec le PLGA, un copolymère composé d'unités répétitives d'acide lactique et d'acide glycolique suivant un agencement variable en fonction des propriétés intrinsèques voulues et des applications recherchées. Comme matrice, le PLGA est le polymère le plus utilisé en clinique (Nair & Laurencin, 2007). Sa dégradation est initiée par la rupture des liaisons esters qui aboutit à la formation de deux monomères (figure 4) : l'acide lactique et l'acide glycolique (Amann *et al.*, 2010; Ramchandani & Robinson, 1998). L'acide lactique et l'acide glycolique formés, rejoindraient le cycle de Krebs où ils seront métabolisés en CO₂ et H₂O (Athanasίου *et al.*, 1996; Crotts & Park, 1998; Kimura *et al.*, 1988). Le PLGA est utilisé dans de nombreux domaines comme l'imagerie, le diagnostic *in vitro* et les biomatériaux. Cependant, sa principale application demeure dans l'industrie biomédicale où il joue le rôle d'excipient pharmaceutique.

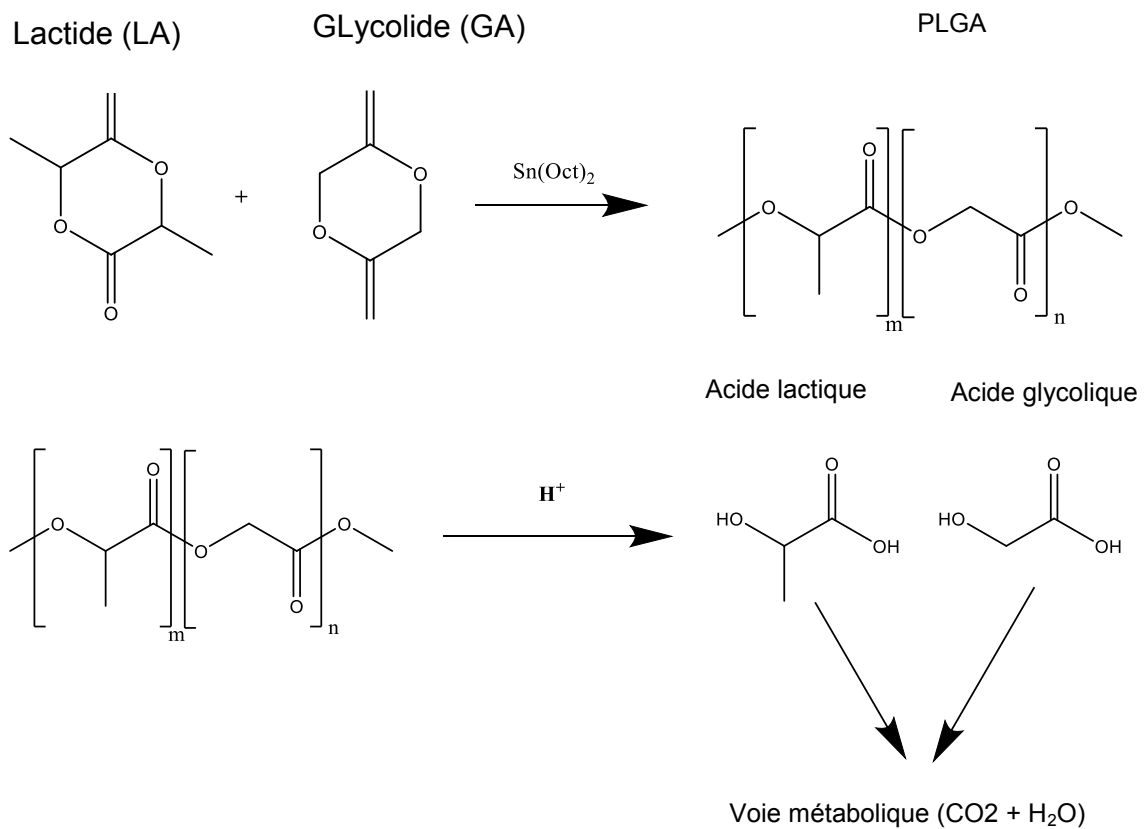


Figure 4. Mécanisme de synthèse utilisant la polymérisation par ouverture de cycle (ROP) et hydrolyse en milieu acide du PLGA

En effet, leurs propriétés de surface et leurs tailles, les rendent très vulnérables au phénomène d'opsonisation, la capture par les cellules du système des phagocytes mononucléés, des interactions avec les membranes cellulaires (Passirani *et al.*, 1998; Rabanel *et al.*, 2012). De plus, elles ne permettent pas d'atteindre spécifiquement la cible thérapeutique lorsqu'elles échappent à ces phénomènes. Pour les formulations à visée cérébrale par exemple, cette distribution inadéquate pourrait aussi provoquer les effets secondaires liés à une action périphérique.

1.2.2 Les nanoparticules de deuxième génération

L'un des buts de l'utilisation des nanoparticules est d'augmenter le temps de circulation des formulations et donc la durée de vie des principes actifs dans la circulation sanguine. Les systèmes de première génération sont plus vulnérables à la reconnaissance par les opsonines et l'élimination par des organes comme les reins, le foie et la rate. Parmi les facteurs favorisant ce phénomène, on peut citer la taille et des caractéristiques de la surface des nanoparticules comme la charge et l'hydrophobicité (Bertrand & Leroux, 2012; Bertrand *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012). Plus précisément, les surfaces seront marquées par des opsonines qui sont ensuite phagocytées par les macrophages du foie ou cellules de Kupffer, les macrophages de la rate, les macrophages des poumons ou encore les macrophages présents dans le sang. Ceci pourrait limiter la dose atteignant les sites d'action.

Les systèmes de deuxième génération seront donc proposés. Il consiste à ajouter sur la surface de nanoparticules un revêtement hydrophile. Certains chercheurs atteignent cet objectif à l'aide de techniques basées sur l'adsorption physique des polymères hydrophiles comme le polysorbate 80 ou encore le poly(éthylène glycol) (PEG) (Lockman *et al.*, 2002). Il est également possible de les modifier de manière covalente à l'aide de polymère comme le PEG (Khalil *et al.*, 2013), on parlera des diblocs de PLGA-PEG, PLA-PEG ou encore de les modifier par des polysaccharides (Passirani *et al.*, 1998). Le PEG présente l'avantage d'être non toxique, biocompatible, soluble en milieu aqueux et limite l'immunogénicité des surfaces nanoparticulaires (figure 5). Ceci rend cette surface hydrophile et permet aux formulations d'éviter, ou au moins de limiter, leur contact avec les protéines plasmatiques, réduisant les phénomènes de reconnaissance rapide par le système des phagocytes mononucléés, ce qui augmente le temps de circulation sanguine (Lockman *et al.*, 2002). Toutefois, les effets secondaires liés à une biodistribution non spécifique demeurent (Gref *et al.*, 1994).

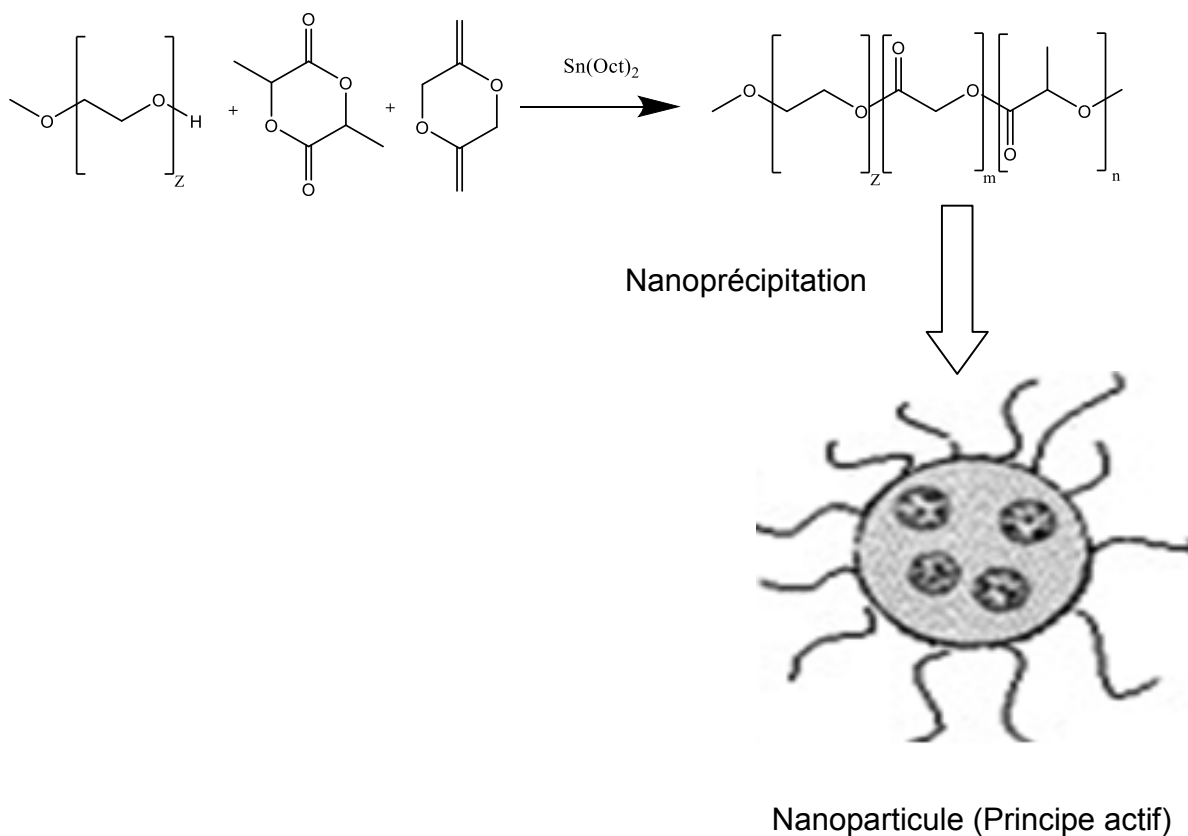


Figure 5. Illustration des systèmes nanoparticulaires de deuxième génération, le polymère PEG assurant la furtivité.

Plusieurs études ont été réalisées afin de ressortir les densités, les tailles et l'architecture idéales de PEG à la surface des NPs en fonction des applications (Moghimi *et al.*, 2001; Rabanel *et al.*, 2015a; Rabanel *et al.*, 2015b; Rabanel *et al.*, 2014). De manière générale, on note que pour des tailles similaires, une chaîne ramifiée confère une meilleure furtivité et activité biologique qu'une chaîne linéaire. Par contre, pour des masses molaires inférieures à 2000 Da, on note une faible amélioration du temps de circulation, d'où l'intérêt des chaînes ramifiées de taille supérieure à 2000 Da. Toutefois, les résultats obtenus sont tributaires du type de surface de la nanoparticule, du type cellulaire et bien d'autres facteurs.

1.2.3 Les nanoparticules de troisième génération

L'un des défis d'actualité impliquant la chimie médicinale et les pathologies du système nerveux central est l'administration spécifique des molécules dans le cerveau. Les systèmes de troisième génération utilisés actuellement, sont constitués du polymère renfermant la molécule, quelques fois d'une molécule hydrophile sur la surface, mais surtout caractérisés par la présence d'un ligand qui permet la reconnaissance d'un récepteur ou toutes autres molécules cibles. La molécule de surface pourrait être un peptide, une protéine ou ligand, un anticorps (Karmani *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Kuo & Chao, 2016; Montenegro *et al.*, 2013; Rezaeipoor *et al.*, 2009; Tada *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013b; Xu *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2008b), d'autres molécules naturelles comme le folate (Chen & Borden, 2010), l'acide aspartique (Zarabi *et al.*, 2014), des saccharides ou encore des oligonucléotides encore appelés aptamères (Ni *et al.*, 2015; Taghdisi *et al.*, 2016), le glutathion (Acharya & Reddy, 2016; Grover *et al.*, 2014; Jain & Jain, 2015; Kerklaan *et al.*, 2016; Patel & Acharya, 2012; Raval *et al.*, 2015; Rip *et al.*, 2014).

Ce système de reconnaissance spécifique permet d'améliorer la concentration de la molécule dans l'organe cible (Pirollo & Chang, 2008). Dans le cas des formulations ciblant le CNS, plusieurs systèmes tels que la conjugaison des particules de polyéthylèneimide et du PEG (dibloc) avec la transferrine ou l'insuline ont démontré une certaine efficacité (Kabanov & Batrakova, 2004; Lockman *et al.*, 2003). De manière générale, dans la conception de ces systèmes, l'utilisation du PEG ou de toutes autres molécules confère non seulement des propriétés de furtivité, mais aussi permette une meilleure reconnaissance du ligand. Ce qui maximise la probabilité des interactions ligand-récepteur. L'internalisation cellulaire de ces formulations est fonction de leurs propriétés physicochimiques notamment la taille, la charge surfacique, et de la reconnaissance des récepteurs présents sur l'organe cible.

Afin de permettre une meilleure caractérisation biologique des NPs et purement pour des questions de recherche, il est possible d'ajouter un fluorophore de manière

covalente comme la rhodamine ou encore imbriqué dans la matrice comme le lumogène rouge, qui va permettre le suivi de la matrice dans la cellule (Ankrum *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Meder *et al.*, 2016; Paka *et al.*, 2016; Trofymchuk *et al.*, 2014).

1.2.4 Le marché des nanoparticules

La première apparition des nanoparticules comme transporteurs de principes actifs en clinique se situe dans les années 1990. Par exemple, les liposomes PEGylés renfermant la doxorubicine a aussi vu le jour sous le nom commercial Doxil[®] aux États-Unis et Caelys[®] au Canada (Barenholz, 2012). En 2005, l'Abraxane[®], par la compagnie Abraxis Biosciences, est la première formulation à base de nanoparticules d'albumine chargées de paclitaxel à être approuvée par la FDA pour des injections intraveineuses chez les patients souffrants du cancer du sein. Très récemment la compagnie Altus Formulation a mis sur le marché le PPI-1502, une formulation de propofol injectable à partir de copolymère amphiphilique et dibloc nommé poly (N -vinyl-2-pyrrolidone)-poly-(D, L-lactide) (PVP-PLA) (Ravenelle *et al.*, 2008). Plusieurs formulations nanoparticulaires à bases de polymères biodégradables ou de protéines sont actuellement en cours d'études précliniques (Kargul *et al.*, 2016; Schutz *et al.*, 2013; Skotland *et al.*, 2014).

1.3 Application des nanoparticules comme outil dans le traitement des MNDs

Le traitement des maladies du SNC telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie Huntington, la schizophrénie et les tumeurs du cerveau demeure limité en raison des difficultés à traverser la BHE.

1.3.1 La BHE : l'obstacle à franchir par les formulations à visée cérébrale

La BHE est une interface hautement sélective qui régule les échanges entre le parenchyme cérébral et le sang. La BHE est constituée par une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale, sur laquelle on retrouve des péricytes et des prolongements astrocytaires (voir figure 6). Les jonctions serrées, principale caractéristique des cellules endothéliales du SNC, se composent de protéines transmembranaires telles que l'occludine, la claudine et la JAM (junctional adhesion molecule) qui forment un réseau de fibrilles lié avec des protéines intracellulaires comme les protéines ZO-1 et 2 (*zonula occludens*), elles-mêmes reliées à l'actine du cytosquelette. Tout ceci participe à l'étanchéité de la BHE qui est de ce fait une barrière physique, mais aussi biologique, notamment de par la présence des pompes d'efflux et son activité métabolique (Rabanel *et al.*, 2012; Taylor, 2002). Il a été rapporté une forte expression de pompes d'efflux telles que la P-glycoprotéine (P-gp), d'autres protéines de la famille des *multidrug resistance-associated proteins* sur les cellules endothéliales de la BHE. Elles participent donc à empêcher certaines substances étrangères d'atteindre le SNC ou alors facilite leur élimination cérébrale. La P-gp est une protéine transmembranaire d'environ 170 kDa qui utilise l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP (Cecchelli *et al.*, 2007). Il a été montré une accumulation plus importante de plaques amyloïdes dans le cerveau des souris transgéniques n'exprimant pas la p-gp (Bruckmann *et al.*, 2016; Cirrito *et al.*, 2005). Dans le même, il a été démontré une faible expression de la P-gp au niveau de la BHE des patients atteints de la MA (Vogelgesang *et al.*, 2004).

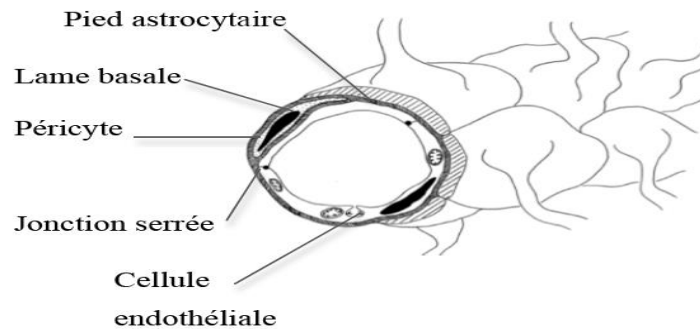


Figure 6: Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique selon (Strazielle & Gherzi-Egea, 2005)

1.3.2 Le transport des molécules à travers la BHE

À cause des propriétés propres aux cellules endothéliales du cerveau, l'efficacité des molécules ciblant le cerveau est fonction d'un certain nombre de facteurs notamment de leur taille, leur solubilité, leur poids moléculaire, leur caractère liposoluble, son pKa et sa biodisponibilité cérébrale. Les substances lipophiles ou de petites tailles (< 500 Da), traversent la BHE par diffusion passive, tandis que le transport de nutriments (le glucose, certains acides aminés, les acides monocarboxyliques, les nucléosides, les purines, les amines, le glycérol, l'urée et des vitamines) se fait par diffusion facilitée par les transporteurs ou par des canaux ioniques présents à la surface de la BHE. Pour les molécules de plus grosses tailles, le transport vers le parenchyme cérébral se fait uniquement via les transports vésiculaires: on distingue la transcytose par adsorption et celle via les récepteurs.

1.3.3 Étude de la perméabilité à travers la BHE

Les méthodes généralement utilisées pour reproduire les propriétés de la BHE incluent les méthodes bio-informatisées (*in silico*), les modèles dynamiques, les mono-, les co- et les tricultures statiques (Cucullo *et al.*, 2005). Les méthodes *in silico* utilisent les valeurs de perméabilité typique de la BHE (solubilité, hydrophobicité, masse moléculaire, interaction hydrogène, distribution des charges) *in vivo* pour simuler et prédire les interactions d'un composé avec le milieu biologique. Bien que ce modèle permette l'évaluation rapide d'un large spectre de composés, il s'applique beaucoup plus pour des tests de criblage de petites molécules.

Plusieurs chercheurs utilisent des lignées cellulaires immortalisées dans leurs modèles de BHE du fait de la simplicité de culture qu'elles offrent par rapport aux cultures cellulaires primaires (Cecchelli *et al.*, 2007). Dans ce sens, les lignées d'origine non cérébrale à l'instar des cellules Caco-2 (lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique) et MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells) sont souvent utilisées pour l'évaluation de la perméabilité des composés mais leur origine, la composition de leur membrane et par conséquent leur architecture épithéliale leur confèrent une structure différente de celle des cellules endothéliales cérébrales. Ceci pose problème quant à leur habilité réelle à prédire le passage des composés à travers la BHE *in vivo* (Di *et al.*, 2009; Lacombe *et al.*, 2011). La validation de tels modèles requiert l'expression des P-gp, qui assurent un rôle protecteur au niveau des barrières biologiques *via* le transport des molécules lipophiles de l'épithélium intestinal vers la lumière intestinale, pour les caco-2 par exemple. Il a été montré une forte expression des P-gp sur la face apicale des caco-2 à confluence (Wils *et al.*, 1994).

La co-culture des astrocytes et des neurones, et dans certains cas en tri-culture avec des péricytes permet de mieux mimer les propriétés de la BHE (Hoheisel *et al.*, 1998; Omid *et al.*, 2008). Le tableau 1 récapitule quelques exemples des différents modèles utilisés en recherche pour mimer la perméabilité à travers la BHE.

Tableau 1 : Quelques modèles expérimentaux utilisés pour l'étude de la perméabilité à travers la BHE

Modèle d'étude	Avantages	Limites	Remarques et exemples	Références
Modèle <i>in vitro</i> de BHE	Criblages à large échelle	Diffusion uniquement Néglige les pompes d'efflux	Dicetopiperazine, N-méthyl-Phe phenylproline	(Arranz-Gibert <i>et al.</i> , 2015; Malakoutikhah <i>et al.</i> , 2014; Malakoutikhah <i>et al.</i> , 2010; Malakoutikhah <i>et al.</i> , 2008; Teixido <i>et al.</i> , 2007)
Utilisation des lignées de cellules neuronales (SK-N-SH)	Criblages à large échelle Études des mécanismes de transport endocytaire	Pas de prédictions de la perméabilité à travers la BHE Expression des molécules de surface différentes L'action des inhibiteurs est parfois fonction du type cellulaire	Angiopep-2	(Demeule <i>et al.</i> , 2008; Li <i>et al.</i> , 2011; Paka <i>et al.</i> , 2016)
Modèle cellulaire	Bonne corrélation avec	Comparaison difficile entre les	l'Angiopep-2,	(Niewoehner <i>et al.</i> , 2014; Prades

utilisant des inserts poreux	les résultats de perméabilité <i>in vivo</i> des petites molécules Présence des jonctions serrées Expression de nombreuses protéines de surface	modèles particulièrement pour les colloïdes comme les NPs TEER faibles Distribution des récepteurs pouvant être différente Transwell (nombreux facteurs de croissance)		<i>et al.</i> , 2015; Wang <i>et al.</i> , 2013a)
Coupes de cerveau ou homogénats (<i>Ex vivo</i>)	Détection et quantification dans le parenchyme cérébral	Nécessite une bonne maîtrise de dissection Les nombreuses étapes augmentent les risques d'erreurs	Détection des principes actifs marqués (^3H et ^{14}C) et encapsulés dans des liposomes conjugués au GSH et à l'angiopep-2	(Bockenhoff <i>et al.</i> , 2014; Kumar <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2014; Zong <i>et al.</i> , 2014)

1.3.4 Les ligands ciblant le SNC

En raison de l'échec de nombreux agents thérapeutiques à visée cérébrale, des méthodes invasives et non invasives ont été proposées. Parmi les méthodes invasives, nous pouvons citer : le changement de la perméabilité de BHE, l'infusion intracérébrale directe et la transplantation du médicament. Il est indéniable que les méthodes non invasives comme l'administration systémique demeurent privilégiées au vue de la meilleure préservation de l'homéostasie cérébrale qu'elles confèrent, du confort du patient et la facilité d'administration.

Le but de l'administration systémique est donc de traverser la BHE en concentration suffisante sans un effet négatif sur les fonctions de la BHE. Parmi les transporteurs utilisés, les NPs, biodégradables et biocompatibles se retrouvent en tête de liste. Ceci s'explique par leur faible toxicité, leur capacité à moduler la libération du principe actif sur le temps, l'augmentation de la biodisponibilité systémique et cérébrale et par conséquent l'efficacité thérapeutique en bout de ligne. De nombreux ligands ciblant le SNC sont aussi cités dans la littérature afin de cibler des récepteurs prépondérants à la surface de la BHE. Il s'agit par exemple des apolipoprotéines, des ligands des récepteurs de la famille des lipoprotéines de faibles densités (LDLR).

Les LDLR regroupent une famille de récepteurs d'endocytose qui assure l'apport de cholestérol vers différents organes et plus particulièrement vers le cerveau. Certains LDLR sont donc spécifiquement sur exprimées à la surface des cellules endothéliales qui forment la BHE (Dehouck *et al.*, 1997a; Dehouck *et al.*, 1997b; Lucarelli *et al.*, 2002). Plusieurs travaux ont montré que cette famille de récepteurs pourrait être utilisée pour l'administration ciblée des médicaments vers le CNS.

Les LDLR possèdent principalement deux ligands l'apolipoprotéine B (ApoB 100) et l'ApoE. Suite à la liaison de l'ApoB100 ou de l'ApoE au récepteur, la lipoprotéine contenant le cholestérol serait internalisée par endocytose. L'ApoE posséderait une affinité 10 à 100 fois supérieure à celle de l'ApoB (Innerarity & Mahley, 1978). Chez les

souris KO pour le gène de l'ApoE il a été observé des perturbations de l'apprentissage et de la mémoire (Krzywkowski *et al.*, 1999). Dans l'hippocampe, l'absence de l'ApoE provoque des dommages oxydatifs (Ramassamy *et al.*, 2001).

De même, le greffage des lipoprotéines sur des liposomes contenant certains principes actifs comme le méthotrexate ou le paclitaxel a été utilisé pour cibler spécifiquement les cellules exprimant les LDLR (Malcor *et al.*, 2012). Plusieurs chercheurs ont proposé des formulations comportant l'ApoE3 à la surface permettant d'accroître l'internalisation neuronale du curcumin (Mulik *et al.*, 2010a; Zensi *et al.*, 2009) ainsi que leur présence dans le cortex cérébral des souris ayant reçu les formulations par voie iv. Des tests complémentaires de fixation sur les cellules endothéliales ont permis de montrer un mécanisme de transport via l'endocytose.

Ainsi, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées afin d'étudier les caractéristiques physicochimiques idéales des formulations de type PLGA, leur cytotoxicité, les mécanismes d'internalisation et de perméabilité à travers la BHE.

Tableau 2 : Quelques exemples de ligands ciblant le CNS utilisés pour la modification surfacique des NPs de type PLGA.

Matrice	Modification de surface	Potentiel zêta (Taille)	Molécule Encapsulée	Résultats	Références
PLGA	peptide Tet-1	-30 (200 nm)	curcumin	Pas de toxicité Meilleure internalisation neuronale	(Mathew <i>et al.</i> , 2012)
PEG-PLGA	Transferrine	-4,3 (121 nm)	Temozolomide (cancer)	Meilleure biodisponibilité cérébrale sur de rats albinos (iv)	(Jain <i>et al.</i> , 2011)
PLGA	Glycopeptide	-10 (210 nm)	ZnSO ₄	Non toxique, Optimisation de l'endocytose	(Grabrucker <i>et al.</i> , 2011)
PEG-PLGA	Anticorps anti transferrine (OX 26)	/ (105 nm)	Tempol	Meilleure internalisation cellulaire	(Carroll <i>et al.</i> , 2010)
PEG-	Lactoferrine	-14	Urocortine	Meilleur effet	(Hu <i>et al.</i> , 2011)

PLGA		(120 nm)		thérapeutique (par la veine caudale de rats)	
PLGA	Angiopep- 2	38 (200 nm)	doxorubicine	Traverse la BHE chez les souris (iv)	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
PLGA- PEG	GSH adsorbé	/ (240 nm)	Paclitaxel	Traverse la BHE	(Geldenhuis <i>et al.</i> , 2011)

1.3.5 Le glutathion comme agent de ciblage

Dans le cas du GSH, plusieurs travaux ont proposés les liposomes conjugués au GSH comme système de transport pour l'administration des médicaments au cerveau (Gaillard *et al.*, 2012; Lindqvist *et al.*, 2013). De nombreuses autres études ont montré une augmentation de la quantité de doxorubicine dans le cerveau des rats recevant les liposomes conjugués au GSH (Rip *et al.*, 2010). Plusieurs formulations conjuguées au GSH ont été rapportées pour mener à l'augmentation de la présence des formulations dans le SNC sur des modèles animaux, incluant la formulation de liposomes PEGylées et conjuguées au GSH (Gaillard *et al.*, 2014; van der Meel *et al.*, 2013).

Il en est de même pour les NPs de types PLGA modifiées au GSH par des liaisons non-covalentes (Geldenhuis *et al.*, 2014). Dans ce système, l'utilisation d'un modèle *in vitro* de BHE a montré une meilleure perméabilité des formulations avec le GSH adsorbé à la surface. D'autres ligands de petites tailles sont cités dans la littérature (voir tableau 2). Cependant, les mécanismes par lesquels le GSH influencerait la perméabilité à travers la BHE ou l'internalisation neuronale demeurent très peu connus. On note une certaine distribution des transporteurs du GSH sur la BHE à l'instar du transporteur *excitatory amino acid carrier-1* (EAAC1) donc l'expression diminue avec l'âge (Aoyama *et al.*, 2006).

1.4 Préparation des nanoparticules modifiées par des ligands

1.4.1 Méthodes de préparation des nanoparticules polymères

Diverses méthodes de préparation existent dans la littérature et dépendent généralement du produit à encapsuler et du type d'application. Il s'agit principalement de l'émulsion-diffusion, la nanoprécipitation et ses variantes comme la nanoprécipitation *flash* ou les techniques de microfluidique que nous ne développerons pas dans cette thèse.

La méthode par émulsion-évaporation de solvant regroupe la technique par simple émulsion qui permet d'encapsuler des composés hydrophobes et celle par double émulsion pour les composés hydrophiles. Elle nécessite au préalable la formation d'une émulsion plus ou moins stable par ajout d'une phase organique dans une phase aqueuse. La présence des surfactants ou tensio-actifs permet une émulsion plus stable. Lors de la diffusion de la phase organique dans la phase aqueuse, les particules sont formées et se solidifieront pendant l'évaporation (Bodmeier & McGinity, 1987; Hans & Lowman, 2002). Dans la méthode dite d'émulsion-diffusion, la taille des NPs dépendrait de la nature du solvant utilisé ainsi que leur ratio (phase organique/ phase aqueuse), le débit du mélange ainsi que la vitesse d'agitation (Niwa *et al.*, 1994).

La nanoprécipitation est une méthode très simple, rapide, très reproductible et à faible coût énergétique. Pour sa réalisation, des solvants organiques miscibles ou partiellement miscibles tels que l'acétone, le tétrahydrofurane ou le DMSO sont mélangés avec une phase aqueuse. Les NPs sont formées par des interactions qui naissent dans la zone de contact entre la phase aqueuse et la phase organique. La taille des particules formées est donc fonction de la vitesse de mélange des phases et la concentration du polymère dans la phase organique. Les facteurs comme la température, le ratio de la phase organique / phase aqueuse étant négligeable pour ce qui est de l'effet sur la taille. Il a été montré que l'acétone conduit à la formation des NPs

plus petites avec un meilleur rendement contrairement au tétrahydrofurane (Barichello *et al.*, 1999).

1.4.2 Techniques de conjugaison

Plusieurs techniques ont été utilisées pour greffer des molécules biologiques à la surface des NPs. Nous pouvons les classer en deux grandes catégories : les stratégies impliquant la formation des liaisons covalentes et celles impliquant les interactions par affinités.

1.4.2.1 La conjugaison non covalente des ligands sur les nanoparticules polymères

Ce mode de couplage se base sur les interactions non covalentes, impliquant de très fortes affinités entre des molécules précises. La forte fixation de la streptavidine sur la biotine (avec une constante de dissociation d'environ 10^{-15} M) fait de ce système l'une des méthodes les plus utilisées pour la conjugaison non covalente des molécules. En général, l'une des molécules, la streptavidine par exemple, est fixée de manière covalente sur la nanoparticule (Bickel *et al.*, 2001; Pardridge, 1999; Yang *et al.*, 2008a) et interagira avec la biotine conjuguée au ligand. Les interactions entre la protéine A et un anticorps sont aussi utilisées (Colombo *et al.*, 2012).

1.4.2.2 La conjugaison covalente des ligands sur les nanoparticules polymères

Bien que la taille et les propriétés surfaciques (charge et nature du ligand) soient des facteurs qui influencent l'internalisation, les stratégies actuelles consistent à conjuguer une molécule biologique, dotée de groupements fonctionnels à la surface de la particule afin de permettre une internalisation spécifique. Dans la plupart des cas, ces groupements fonctionnels sont les sulfhydryles (-SH), les hydroxyles (-OH), les amines libres (-NH₂), les carboxyles (-COOH) présents naturellement sur la chaîne latérale ou en position terminale de certains acides aminés.

Nous nous attarderons sur les techniques les plus utilisées pour le greffage des molécules d'intérêt de nature protéique. L'une des techniques utilisées consiste en la réaction entre un groupement -COOH activé et une amine primaire conduisant à la formation des amides. Les groupements -COOH pourraient être activés via l'utilisation du système 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide afin de permettre leur réactivité avec les -NH₂ libres du ligand protéique. Le protocole décrit par Fischer (Fischer, 2010) est utilisé pour cette fin. Une autre méthode couramment utilisée en chimie médicinale est la réaction entre les thiols et les maléimides avec formation des liaisons thioéthers. Cette technique a été utilisée dans cette thèse (figure 7).

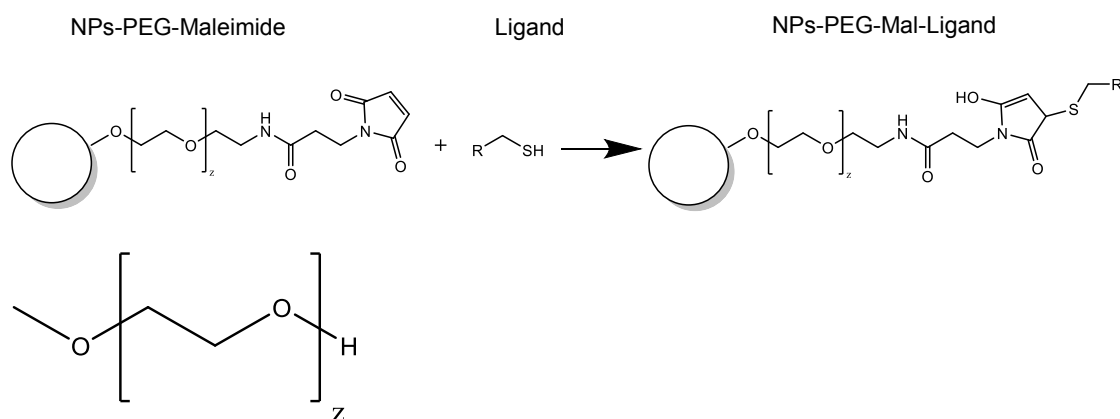


Figure 7 : Conjugaison directe utilisant la réaction maléimide et thiol ; Structure du polyéthylène glycol (PEG)

Dans la pratique, cet exercice pourrait perturber la structure, la fonction ou alors la conformation de la molécule. Par exemple, la présence du groupement réactionnel dans la zone de reconnaissance du récepteur sur la protéine. Plusieurs méthodes sont utilisées afin de réduire ces risques notamment l'introduction d'un groupement fonctionnel sur des sites plus stables structurellement. Dans ce sens, l'utilisation des « *linkers* » homobifonctionnels ou hétérobifonctionnels est aussi recommandée lorsque le groupement réactionnel souhaité est absent aussi bien à la surface de la particule ou de la molécule d'intérêt. Il s'agit des structures chimiques constituées des groupements précis en bout de chaînes et reliées par un espaceur ou « *spacer* » (constitué de polyéthylène glycol (PEG) dont la taille varie en fonction des applications.

Le PEG utilisé comme « *spacer* » permet de réduire les interactions entre la protéine et la surface de la NPs (Torchilin *et al.*, 1994). Dans ce même registre, le PEG bi-fonctionnalisé permet aussi de réduire les fixations non spécifiques de la protéine sur la nanoparticule tout en maintenant une orientation stable (Salvati *et al.*, 2013). L'insertion

des groupements thiols est effectué sur les protéines afin de contrôler le nombre de sites de conjugaison et de réduire les risques de modification des propriétés de la molécule d'intérêt. L'ajout de thiols se fait cependant sur d'autres fonctions et de manière non spécifique à l'aide du réactif de Traut's par exemple.

Ainsi, étant donné la présence du maléimide libre à la surface des formulations à base de PLGA-PEG-Mal, des liaisons covalentes pourraient être formées à partir des thiols libres de la protéine, ceci suivant une réaction thiols-maléimides. Le principal inconvénient est que les thiols et les maléimides sont particulièrement instables en solution. En effet, tandis que les thiols peuvent s'oxyder selon les conditions utilisées, les maléimides peuvent potentiellement réagir avec certains groupements nucléophiles.

1.4.3 Technique de caractérisation des nanoparticules polymères modifiées

La détermination de la taille, la forme, le degré d'homogénéité des particules, l'indice de polydispersité et le potentiel Zeta permet de mieux caractériser les NPs. Le potentiel Zeta nous informe sur les interactions ioniques présentes entre les particules. Ce paramètre est déterminé par mesure du déplacement électrophorétique des NPs suite à un champ électrique dans un environnement conducteur. Le potentiel mesuré n'est pas directement relié à la charge de surface. Cependant, il joue un rôle clé sur la stabilité des NPs (Hans & Lowman, 2002). Une formulation est considérée stable si le potentiel Zeta entre les particules est supérieur à ± 30 mV, particulièrement pour les suspensions stabilisées par des répulsions électrostatiques. Dans la majorité des cas, des agents tensioactifs ou des polymères agissent aussi comme des stabilisateurs (Muller *et al.*, 2001). La taille et le potentiel Zeta sont déterminées par diffusion dynamique de lumière causée par le mouvement Brownien (pour la taille) et le mouvement électrophorétique (potentiel Zeta) des particules [431]. La microscopie électronique est généralement utilisée afin de confirmer les résultats obtenus au DLS mais fournit également des informations concernant la morphologie des NPs. La conjugaison covalente des ligands neutres à la surface des NPs pourrait réduire le nombre de groupements chargés. De ce

fait, la variation du potentiel Zeta pourrait nous donner une idée sur l'effectivité du greffage.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour détecter la présence des molécules à la surface des NPs. Parmi ces techniques, nous pouvons citer la microscopie à force atomique (MFA), la spectroscopie de photoélectrons rayon X (XPS). La résonance magnétique et nucléaire (RMN) ou alors la *Fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR). Pour des molécules de plus grosse taille la XPS est généralement applicable. La concentration de ligand (protéine) peut aussi être déterminée de manière colorimétrique, ou à l'aide de la technique ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Des tests de reconnaissance du récepteur sont aussi indiqués pour caractériser les molécules à la surface des NPs.

L'étude de la cinétique de libération de la molécule encapsulée est également un paramètre dans la caractérisation des systèmes nanoparticulaires. Elle affecte la biodisponibilité, les interactions cellulaires, la pharmacocinétique ainsi que la concentration au niveau de leur site d'action. De nombreux paramètres affectent le relargage des molécules encapsulées comme l'hydrophobicité des composés, la température, le pH, les enzymes, leur poids moléculaire, la taille des NPs et la porosité de la formulation.

Aussi, les caractéristiques de surface, tels que la charge, la nature du polymère et la présence des ligands ou de surfactants, pourraient moduler significativement le mode d'internalisation. Ces mécanismes d'internalisation seront détaillés dans la section suivante.

1.5 Internalisation des nanoparticules polymères

Cette dernière décennie a été marquée par de nombreux efforts dans le but de développer des plateformes nanoparticulaires applicables dans la médecine personnalisée. Dans ce sens, la modification surfacique des NPs par des biopolymères, des ligands peptidiques ou protéiques est souvent utilisée. Ces systèmes nanoparticulaires ainsi constitués et chargés de principes actifs verront leur temps de circulation augmenter, mais surtout une distribution ciblée. La majorité des travaux rapportent que les processus d'endocytose seraient le mécanisme préférentiel d'entrée des NPs (Chaudhury & Das, 2011; Chaudhury *et al.*, 2011; Wattiaux *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2015). Ainsi, les facteurs influençant les mécanismes d'internalisation des NPs sont la taille, la forme, la charge de surface, l'hydrophobicité, les modifications surfaciques ainsi que le type cellulaire et de son état physiologique.

L'endocytose est un processus qui nécessite de l'énergie. Elle est utilisée par les cellules pour internaliser les biomolécules ou éléments présents dans leur environnement extracellulaire (Iversen *et al.*, 2011). Ce mécanisme requiert un réarrangement des membranes cellulaires avec formation des vésicules qui piègent les molécules de diverses origines. Son mécanisme est fortement régulé et conditionne le devenir des particules internalisées.

Les processus d'endocytose peuvent être classifiés en deux catégories : la phagocytose et la pinocytose (Conner & Schmid, 2003). La phagocytose est un processus caractéristique des cellules spécialisées comme les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Elle est utilisée pour l'internalisation des corps étrangers de l'ordre de 0,5 μm (Young, 2006). La pinocytose est utilisée dans la plupart des cellules. Elle regroupe plusieurs mécanismes spécifiques d'internalisation des fluides, solutés et suspensions nanoparticulaires sur lesquelles nous nous attarderons. La pinocytose regroupe la macropinocytose, l'endocytose dépendante des clathrines, l'endocytose dépendante des cavéoles et l'endocytose indépendantes de ses deux

protéines (figure 8). Une caractéristique importante de la pinocytose est la formation de vésicules d'endocytose qui fusionnent avec les endosomes précoces, d'environ 400 nm et de pH avoisinant 6.5, à l'intérieur desquelles s'effectuent le tri et la distribution des particules (Sahay *et al.*, 2010a; Vercauteren *et al.*, 2010).

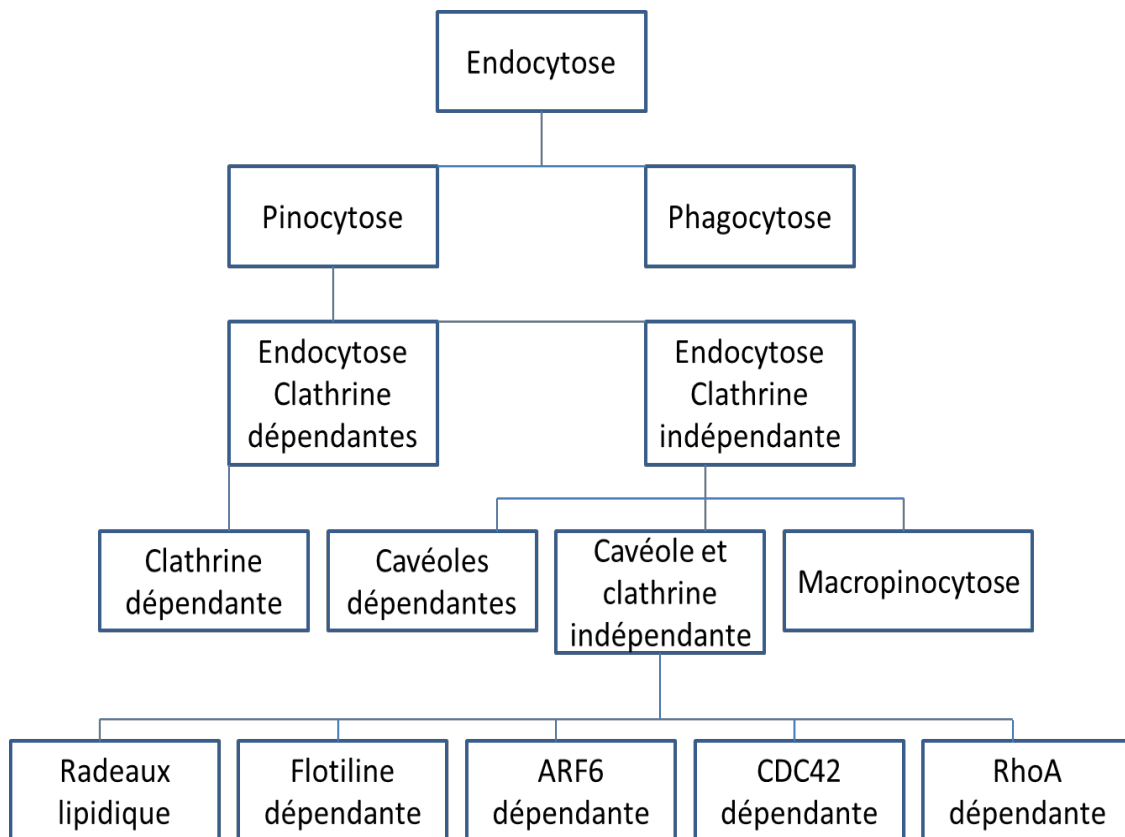


Figure 8 : Classification des différents processus d'endocytose.

Une fois internalisées par endocytose, les particules seront emprisonnées dans différents types de vésicules à savoir des endosomes précoces, des phagosomes ou alors des macropinosomes. Ces vésicules chargées se transformeraient en corps multivésiculaires ou encore en endosomes tardifs qui fusionneront avec les lysosomes pour suivre la voie de dégradation en fonction des conditions. Cependant, les NPs

pourraient éviter la dégradation lysosomale soit via les endosomes précoces ou alors via les endosomes de recyclage par un mécanisme encore mal connu, mais qui serait pH dépendant. On note une diminution graduelle du pH de la membrane cellulaire vers les lysosomes où le pH se situerait entre 4 et 5,5. Les lysosomes contiennent les protéases et d'autres enzymes de dégradation (Schulze *et al.*, 2009).

Il existe d'autres processus comme la libération des particules dans le cytosol, la transcytose et l'exocytose dans le compartiment extracellulaire ou alors la prise en charge par d'autres organites cellulaires (le noyau, les corps multi-vésiculaires, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, les mitochondries, etc). Cependant, la destination finale ne dépend pas de la voie d'internalisation; ceci s'expliquerait par la complexité des interactions entre la panoplie de molécules protéiques de signature des vésicules. De même, des mécanismes différents pourraient aussi impliquer la même protéine dans son processus d'endocytose.

Il est difficile de cerner la régulation des processus d'endocytose en raison de la complexité de l'environnement cellulaire complexe. Ceci rend difficile toute prédiction fidèle des interactions spécifiques lors de la conception d'un modèle d'étude. Il a par exemple été montré que la déplétion du cholestérol des membranes par certains agents pharmacologiques réduit significativement l'internalisation via les cavéoles (Grimmer *et al.*, 2002; Mayor & Pagano, 2007). Cependant, en plus d'être dépendant du type cellulaire, et de son état physiologique, il a aussi été montré que cette déplétion lipidique affecterait aussi la macropinocytose, la voie Rho-A, et la voie clathrine dépendante (Grimmer *et al.*, 2002; Mayor & Pagano, 2007). On note que le besoin cellulaire pourrait aussi réguler la machinerie d'endocytose. Un exemple simple est l'internalisation de l'*epidermal Growth Factor* par endocytose dépendante des clathrines pour induire son activité, ou alors par endocytose dépendante de cavéoles pour l'inhiber (Orth *et al.*, 2006; Park, 2002). Au cours de ce processus, le devenir du récepteur de l'EGF (EGFR) est aussi tributaire de la voie d'internalisation, ce dernier est recyclé en présence de clathrines ou alors subit une dégradation lysosomale pour les voies indépendantes des clathrines (Sigismund *et al.*, 2008).

1.5.1 La Phagocytose

La phagocytose est un processus d'endocytose utilisé par les cellules phagocytaires comme les macrophages, les neutrophiles, les cellules de Langerhans, les monocytes et les cellules dendritiques pour internaliser les larges particules (Aderem & Underhill, 1999; Hillaireau & Couvreur, 2009). Ce processus est majoritairement utilisé pour l'élimination des particules non reconnues, la destruction des cellules compromises et la coordination de la réponse immunitaire. Dans la littérature, il a été suggéré que certains types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales possèderaient une activité phagocytaire à de faibles amplitudes (Hillaireau & Couvreur, 2009). Ce processus nécessite une bonne flexibilité du cytosquelette parfois capable d'internaliser des particules de 20 μm de diamètre. La première étape consiste généralement à la reconnaissance des NPs par des opsonines telles que les immunoglobulines (IgG et IgM), les composés du complément (C3, C4 et C5) et les protéines sériques : on parle d'opsonisation. L'interaction de ces opsonines avec les récepteurs de surface des cellules va provoquer la création des protubérances ou pseudopodes qui vont entourer la nanoparticule dans des phagosomes qui fusionnent avec les lysosomes. Par la suite, elles seront détruites par l'acidification et les enzymes de dégradation lysosomale. Parmi les facteurs induisant la phagocytose, nous pouvons citer la large taille des particules et l'hydrophobicité de la surface des NPs.

Afin de produire l'effet thérapeutique désiré, il importe de contourner cette voie par certains processus de pinocytose.

1.5.2 La Pinocytose

1.5.2.1 La macropinocytose

La macropinocytose est un processus d'endocytose non spécifique au cours duquel la cellule internalise les fluides et les particules micrométriques via la formation de larges vésicules de l'ordre de 0,2 μm à 5 μm (Oh & Park, 2014). La macropinocytose est médiée par l'activation des récepteurs tyrosines kinases qui induit une cascade de signalisation aboutissant à la formation de larges vésicules appelées macropinosomes. Ces vésicules fusionneront avec les endosomes précoces. La taille des macropinosomes oscille entre 0,5 et 10 μm et leur forme est fonction du type de protéines impliquées. Les formes circulaires sont formées par les GTPases multifonctionnelles de la dynamine tandis que les formes lamellaires sont marquées par l'absence de dynamine. Il a été montré que les macropinosomes sont plus susceptibles à la dégradation lysosomale. Exception faite chez les cellules de carcinome épidermoïde A431, où il a été montré que les macropinosomes une fois dans le cytoplasme pourraient transcyter vers la membrane cellulaire et libérer leur contenu dans le compartiment extracellulaire (Mayor & Pagano, 2007). La macropinocytose est citée pour l'internalisation de certains virus comme celui de la variole chez vache (Coyne *et al.*, 2007; Mercer & Helenius, 2008).

1.5.3 Endocytose dépendante des cavéoles

L'endocytose dépendante des cavéoles est un processus d'internalisation cité comme une voie d'internalisation capable d'éviter la dégradation lysosomale et est d'ailleurs utilisé par plusieurs virus et bactéries (Benmerah & Lamaze, 2007; Medina-Kauwe, 2007). De ce fait, dans le domaine de la nanomédecine, elle pourrait permettre une meilleure accumulation des principes actifs potentialisant ainsi leur effet

thérapeutique. Ce processus implique les cavéoles, qui sont des invaginations membranaires riches en lipides et en cavéolines (Benmerah & Lamaze, 2007; Doherty & McMahon, 2009; Nabi, 2009; Schnitzer *et al.*, 1995). L'une des particularités de cette route d'internalisation est la capacité des vésicules formées à éviter les endosomes précoces. Cette action est favorisée par un pH neutre et contribuerait à contourner la dégradation lysosomale (Parton & Simons, 2007). Ce processus est impliqué lors de l'internalisation de plusieurs systèmes nanoparticulaires. Les ligands les plus couramment cités sont l'aminopeptidase P, l'albumine, l'acide folique et les transporteurs du cholestérol (Bareford & Swaan, 2007; Oh *et al.*, 2007). Un autre ligand de ciblage de cette voie est le peptide RGD, qui se fixe sur les récepteurs de l' $\alpha_v\beta_3$ intégrine. Le copolymère de poly L-Lysine PEGylé (PEG-PLL), conjugué à ce peptide (RGD-PEG-PLL) a été utilisé pour l'administration cellulaire de l'ADN (Oba *et al.*, 2008). Les résultats montraient une localisation périnucléaire dans les cellules HeLa et une meilleure internalisation des complexes conjugués par rapport aux formulations non modifiées (Oba *et al.*, 2008). Ce mécanisme d'action est cholestérol dépendant. Ceci explique l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques favorisant la déplétion du cholestérol pour perturber la formation des cavéoles. Les plus couramment utilisés sont la génistéine, la filipine ou la nystatine.

1.5.4 Endocytose dépendantes des clathrines

Il s'agit du mécanisme d'endocytose le plus décrit dans la littérature et responsable de plus de 40% d'endocytose (Benmerah & Lamaze, 2007; Sahay *et al.*, 2010b). L'endocytose dépendante des clathrines comprend une étape d'initiation, de maturation et de scission qui aboutit à la formation d'une vésicule suite à l'action de la dynamine. Toujours au niveau moléculaire, durant ce processus d'internalisation, la stabilisation et le transit intracellulaire des vésicules impliquent de nombreuses molécules adaptatrices encore appelées protéines échafaudages comme l'adaptine, AP-2, les epsines et la bêta-arrestine. Il s'agit d'un processus extrêmement rapide chiffré entre 1-20 secondes

(Loerke *et al.*, 2009). La caractéristique commune est la formation des vésicules, avec un revêtement protéique constitué majoritairement de clathrines, dont la taille oscille entre 100 et 200 nm (Benmerah & Lamaze, 2007; Parkar *et al.*, 2009). Suite à la scission, les vésicules pourraient perdre leur revêtement protéique et fusionner avec les endosomes précoces vulnérables à la dégradation (Schulze *et al.*, 2009). Dans la littérature, il a été décrit que les récepteurs de la transferrine, des LDL, l'EGF et l'insuline utiliseraient cette voie (Benmerah & Lamaze, 2007; Cabezón *et al.*, 2015).

De nombreuses molécules pharmacologiques sont utilisées pour leur action inhibitrice de cette voie. Parmi elles, nous pouvons citer les phénothiazines (Horwitz *et al.*, 1981; Kuratomi *et al.*, 1986; Salisbury *et al.*, 1980), comme la chlorpromazine qui inhibe la formation, le désassemblage du revêtement de clathrine et le recyclage des récepteurs à la surface de la membrane plasmique (dos Santos *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2002). On cite aussi les ionophores monovalents comme la monensine qui agit en perturbant le gradient de protons (Dickson *et al.*, 1982), le sucrose hyperosmotique (Hansen *et al.*, 1993) et le dynasore (Nankoe & Sever, 2006). De par sa capacité à extraire spécifiquement le cholestérol de la membrane plasmique, la méthyl- β -cyclodextrine est aussi citée comme étant capable d'inhiber l'endocytose dépendante des clathrines (Rodal *et al.*, 1999; Subtil *et al.*, 1999).

1.5.5 Endocytose indépendante des clathrines et des cavéoles

Des mécanismes indépendants des clathrines et des cavéoles, faisant intervenir d'autres types de vésicules ou protéines telles que l'Arf6, la flotilline, la Cdc42 ou encore de la RhoA ont été cités (Doherty & McMahon, 2009). Bien que ces mécanismes soient très peu caractérisés, il a été démontré que la voie Rho-A est impliquée dans l'internalisation du récepteur de l'intégrine 2 ainsi que celle de l'IgE, tandis que la voie RhoA est une voie qui participe à la régulation de l'actine du cytosquelette, la voie Arf-6 assure le recyclage de nombreuses molécules (Donaldson *et al.*, 2009). Tous ces médiateurs nécessitent une composition lipidique spécifique et sont tous dépendants du

cholestérol. Les *lipid rafts* ou radeaux lipidiques sont des microdomaines membranaires particulièrement riches en cholestérol et sphingolipides qui endocytent les formulations par des mécanismes dépendants de la dynamine et très similaire à la voie des cavéoles. Très peu de nanoformulations utilisant ces voies sont reportées dans la littérature. Il s'agit des "nano dispositifs" préparés avec des polymères, ou des liposomes conjugués au folate (Lu *et al.*, 2009). Le folate se fixerait sur son récepteur fortement exprimé à la surface des cellules tumorales (Lu & Low, 2002a; Lu & Low, 2002b). Cependant, il a été aussi rapporté que l'internalisation du folate serait fonction du type cellulaire et impliquerait dans certains cas l'endocytose dépendante des clathrines (Doherty & McMahon, 2009; Rijnboutt *et al.*, 1996).

Dans l'ensemble, la taille des NPs serait un facteur clé dans la route d'entrée car les vésicules formées lors des processus d'endocytose possèdent des intervalles de taille bien définis. On parle des tailles de 0.5 à 5 μm pour la macropinocytose, de 100 à 200 nm environ pour la voie dépendante des clathrines, 50 à 100 nm pour la voie des cavéoles et environ 100 nm pour les radeaux lipidiques (Lai *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2007). Selon Harush-Frenkel et ses collaborateurs les NPs cationiques de type PLGA seraient internalisées par les cellules HeLa et MDCK via l'endocytose dépendante des clathrines tandis que les particules anioniques utiliseraient d'autres voies d'entrées (Harush-Frenkel *et al.*, 2007; Harush-Frenkel *et al.*, 2008). Cependant, les particules fortement chargées aussi bien positivement que négativement seraient fortement opsonisées et éliminées par phagocytose (Chonn *et al.*, 1991). D'autres facteurs tels que la géométrie, l'agrégation, la concentration, l'environnement biologique et les conditions expérimentales sont peuvent influencer l'endocytose.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Les MNDs se caractérisent par un ensemble de pathologies progressives qui conduisent à la mort des neurones et à la destruction du système nerveux suite à des lésions diffuses ou limitées à certaines zones spécifiques du cerveau. À l'heure actuelle, aucun traitement curatif n'existe et la recherche des traitements appropriés fait l'objet de nombreux travaux dans le monde entier. Les traitements proposés jusqu'ici font face à plusieurs limites et obstacles en raison de leurs effets secondaires. On note une très faible distribution cérébrale, limitant l'efficacité des molécules. La présence de la BHE est un obstacle considérable qui explique la faible biodistribution cérébrale. La BHE, présente au niveau des capillaires cérébraux, assure le maintien de l'homéostasie cérébrale. En limitant les échanges à travers le parenchyme cérébral, elle assure de manière efficace la protection du SNC contre les substances toxiques, mais empêche aussi le passage des molécules à visée cérébrale.

Depuis plusieurs années, l'utilisation des NPs de type PLGA comme outil de protection et de contrôle de la libération des principes actifs donne des résultats *in vivo* très encourageants notamment pour l'administration des molécules actives dans le cerveau. Le ratio L : G pourrait moduler les propriétés physiques des formulations telles que leur résistance à l'hydrolyse, leur hydrophobicité et la nature des interactions de la matrice polymérique avec la molécule encapsulée ; et par conséquent pourrait moduler les effets biologiques des formulations. Par ailleurs, plusieurs molécules ont été citées dans la littérature pour leur capacité à augmenter l'internalisation des formulations dans les cellules neuronales.

Dans cet élan, notre équipe travaille à développer des NPs encapsulant des molécules actives à partir de polymères biocompatible et biodégradable nommés poly (acide lactique-co-glycolique) (PLGA) de plusieurs ratios. En utilisant un ratio L/G de 65:35, nous avons réussi à encapsuler le curcumin, et montré une internalisation neuronale des formulations ainsi qu'une préservation des propriétés antioxydantes,

antiinflammatoires, neuroprotectrices du curcumin. Nous travaillons actuellement à optimiser ce système et progresser vers des NPs conjuguées capables de traverser la BHE en utilisant les ligands spécifiques. Nous faisons donc l'hypothèse que, les facteurs intrinsèques des formulations tels que la composition matricielle et la modification surfacique par des ligands ciblant le SNC pourraient favoriser les interactions avec les cellules neuronales ainsi que leurs activités biologiques. Plus précisément, la composition matricielle (en acide lactique et glycolique) pourrait moduler l'activité biologique des formulations de type PLGA chargées de curcumin, tandis que la modification de la surface des NPs par le GSH, optimiserait l'internalisation neuronale des formulations ainsi que leur activité neuroprotectrice.

Objectif général

Notre objectif général est donc de définir le meilleur compromis matriciel des formulations de type PLGA chargées de curcumin et formuler un système nanoparticulaire modifié au GSH afin d'étudier son effet sur les mécanismes d'internalisation neuronale ainsi que leurs activités neuroprotectrice.

Objectifs spécifiques

Objectif 1 : Étudier l'effet de la composition polymérique sur les propriétés physicochimiques et l'activité neuroprotectrice des formulations de type PLGA

Dans ce travail, nous avons premièrement étudié l'effet de la composition matricielle en acide lactique et glycolique sur les propriétés physicochimiques et l'activité biologique des formulations chargées de curcumin. Dans cet objectif, nous avons également étudié la localisation intracellulaire du polymère. Ceci a été fait en utilisant un concept de NPs fluorescentes chargées de lumogène-rouge. De plus, nous avons étudié l'effet de nos formulations sur les niveaux d'expression des gènes neuroprotecteurs, aspect jusqu'ici très peu étudié lors de l'investigation des mécanismes biologiques.

Objectif 2 : Synthèse et caractérisation physicochimiques des NPs modifiées au GSH.

Une fois la composition matricielle définie, il importe de modifier la surface des Nps afin d'optimiser l'internalisation neuronale. Nous avons utilisé la réaction thiol maléimide pour conjuguer le GSH à la surface des NPs. L'efficacité de la réaction a été vérifiée par FTIR, par la mesure de l'absorbance du maléimide et la diminution de l'activité antiradicalaire du GSH. L'effet de la modification surfacique sur les propriétés physicochimiques a aussi été étudié dans cette partie.

Objectif 3 : Étude des mécanismes d'internalisation et de neuroprotection des NPs-Cur modifiées au GSH.

Après avoir synthétisé et caractérisé les NPs de type PLGA modifiées au GSH et chargées de curcumin, nous avons voulu étudier leurs effets sur les mécanismes d'internalisation neuronale et l'efficacité neuroprotectrice sur un modèle cellulaire. Nous avons utilisé la rhodamine pour détecter la localisation intracellulaire de la matrice modifiée. Par la suite les mécanismes d'internalisation ont été étudiés à l'aide de différents inhibiteurs des processus d'endocytose. L'activité neuroprotectrice des formulations contre la mort cellulaire causée par un stress oxydatif induit par l'acroléine a été étudiée à l'aide des tests de survie cellulaire et de mort cellulaire. Plus encore, nous avons déterminé l'effet des formulations sur l'augmentation des espèces oxygénées réactives induite par l' H_2O_2 ainsi que sur les niveaux de glutathion intracellulaire.

2 CHAPITRE 2 :

ARTICLE 1

DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00611

Research Article

Neuronal Uptake and Neuroprotective Properties of Curcumin-Loaded Nanoparticles on SK-N-SH Cell Line: Role of Poly(lactide-co-glycolide) Polymeric Matrix Composition

Djiokeng Paka G^{1,2}, Doggui S¹, Zaghmi A¹, Safar R³, Dao L⁴, Reisch A⁵, Klymchenko A⁵, Roullin VG⁶, Joubert O³, Ramassamy C^{1,2}.

¹INRS-Institut Armand Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Quebec H7V 1B7.

²INAF, Laval University, Québec, G1V0A6, Canada.

³Faculté de Pharmacie, EA3452 CITHEFOR, Lorraine, 54000 Nancy, France.

⁴INRS-EMT, Québec H5A 1K6, Canada.

⁵Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67081 Strasbourg, France.

⁶Laboratoire de Nanotechnologies Pharmaceutiques, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal H3T 1J4, Canada.

*Corresponding author : E-mail: Charles.Ramassamy@iaf.inrs.ca

Keywords: Curcumin; nanoformulation; neuroprotective genes; oxidative stress; Tau hyperphosphorylation

Cet article est publié dans ***Molecular Pharmaceutics***, 2016, 13 (2), pp 391–403

2.1 Résumé de l'article 1

Plusieurs études ont montré que l'utilisation des NPs de type PLGA pourrait s'appliquer à l'administration des médicaments dans le cerveau. Cependant la composition de la matrice polymérique jouerait un rôle crucial sur les caractéristiques physico-chimiques de la formulation et par conséquent l'activité biologique.

Notre hypothèse est que la modification du ratio L :G pourrait moduler les propriétés physicochimiques de la formulation dans le sens de prolonger la libération du curcumin et donc améliorer l'efficacité biologique. Utilisant deux polymères de type PLGA (50:50 et 65 :35), nous avons encapsulé le curcumin par EDE (NPs-Cur 50:50 et NPs-Cur 65 :35). Une caractérisation des propriétés physico-chimiques a été effectuée afin de déterminer la taille et la morphologie par DLS et par MET respectivement. Le pourcentage d'encapsulation ou *Encapsulation Efficiency* (EE) et la teneur en principe actif ou *drug loading efficiency* (DLE) du curcumin ont aussi été déterminés par des dosages spectrophotométriques. Utilisant des cellules de neuroblastome humain (SK-N-SH), nous avons étudié la viabilité des cellules en présence des formulations, leurs activités antioxydantes par les tests LDH et Résazurin. L'effet du ratio L :G de la matrice sur l'internalisation cellulaire des formulations a aussi été déterminé par microscopie à fluorescence et confocale, le curcumin étant auto fluorescent. Par immunobuvardage de type Western, les mécanismes neuroprotecteurs des Nps-Cur ont été étudiés sur quelques voies de signalisation impliquées dans la maladie d'Alzheimer notamment les voies keap1/Nrf2, NF-κB et la phosphorylation de la protéine tau. L'effet de la composition de la matrice sur l'expression de certains gènes antioxydants et neuroprotecteurs comme l'apolipoprotéine E, l'apolipoprotéine J, la thioredoxine, la glutaredoxine et la RE1-Silencing Transcription factor a également été étudié. Nous avons comparé les deux types de formulations (PLGA 50:50 et 65:35) pour la majorité des expériences, certains résultats avec les formulations NPs-Cur 65 :35 étant déjà publiés par notre laboratoire (Doggui *et al.*, 2012). L'ensemble des résultats montre que le PLGA 50: 50 serait le meilleur compromis pour l'encapsulation du curcumin.

2.2 Contribution de l'étudiant

Le projet a été mené avec les conseils de mon directeur de thèse, le Pr. Charles Ramassamy. J'ai réalisé toutes les expériences, à l'exception de celles des figures 3c et d, 4 et 5 qui ont été réalisées par le Dr Sihem Doggui. J'ai réalisé l'étude du profil de libération, ainsi que l'interprétation des résultats avec l'aide du Pr Gaelle Roullin. Les Prs Andrey et Andreas ont fourni les formulations renfermant le *lumogen red*. Après la conception de l'expérience et l'extraction de l'ARNm, la RT-PCR a été faite par Ramia et Pr. Olivier Joubert. J'ai analysé et interprété les résultats. J'ai rédigé le manuscrit sauf toutes les sections impliquant les figures 3c et d, 4 et 5 qui ont été couvertes par le Dr Sihem Doggui. La soumission de l'article a été réalisée par mon directeur de thèse le Pr. Charles Ramassamy. J'ai effectué toutes les corrections et répondu aux commentaires sous la conduite de mon superviseur de thèse.

2.3 Neuronal Uptake and Neuroprotective Properties of Curcumin-Loaded Nanoparticles on SK-N-SH Cell Line: Role of Poly(lactide-co-glycolide) Polymeric Matrix Composition.

Ghislain Djiokeng Paka^{1,2*}, Sihem Doggui^{1,2*}, Ahlem Zagmi^{1,2}, Ramia Safar³, Lé Dao⁴, Andreas Reisch⁵, Andrey Klymchenko⁵, V Gaëlle Roullin⁶, Olivier Joubert³, Charles Ramassamy^{1,2#}

¹*INRS-Institut Armand Frappier, 531, Boulevard des Prairies, Laval, Quebec H7V 1B7, Canada*

²*INAF, Laval University, Québec, Canada*

³*Faculté de Pharmacie, EA3452 CITHEFOR, Université de Lorraine, 54000 Nancy, France*

⁴*INRS-EMT, Québec, Canada*

⁵*Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, France*

⁶*Laboratoire de nanotechnologies pharmaceutiques, faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Canada*

* These authors equally contributed

Corresponding author: Email: Charles.Ramassamy@iaf.inrs.ca

Keywords: Nanoformulation, Curcumin, oxidative stress, Tau hyperphosphorylation, neuroprotective genes,



RightsLink®

[Home](#)[Create Account](#)[Help](#)

Title: Neuronal Uptake and Neuroprotective Properties of Curcumin-Loaded Nanoparticles on SK-N-SH Cell Line: Role of Poly(lactide-co-glycolide) Polymeric Matrix Composition

Author: Ghislain Djiokeng Paka, Sihem Doggui, Ahlem Zaghmi, et al

Publication: Molecular Pharmaceutics

Publisher: American Chemical Society

Date: Feb 1, 2016

Copyright © 2016, American Chemical Society

[LOGIN](#)

If you're a **copyright.com user**, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink user** or want to [learn more?](#)

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2017 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#)
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Neuronal Uptake and Neuroprotective Properties of Curcumin-Loaded Nanoparticles on SK-N-SH Cell Line: Role of Poly(lactide-co-glycolide) Polymeric Matrix Composition

Ghislain Djiokeng Paka,^{†,‡} Sihem Doggui,[†] Ahlem Zaghmi,[†] Ramia Safar,[§] Lé Dao,[⊥] Andreas Reisch,[¶] Andrey Klymchenko,[¶] V. Gaëlle Roullin,^{||} Olivier Joubert,[§] and Charles Ramassamy^{*,†,‡}

[†]INRS-Institut Armand Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Quebec H7V 1B7, Canada

[‡]INAF, Laval University, Québec G1V 0A6, Canada

[§]Faculté de Pharmacie, EA3452 CITHEFOR, Université de Lorraine, 54000 Nancy, France

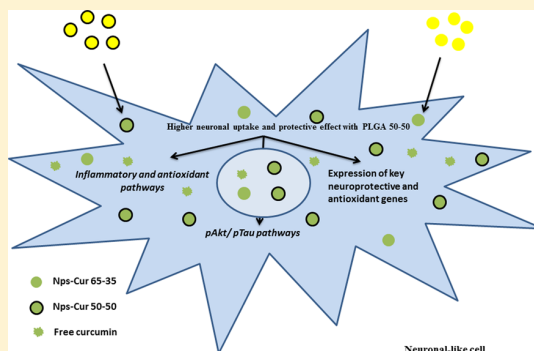
[⊥]INRS-EMT, Québec H5A 1K6, Canada

[¶]Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67081 Strasbourg, France

^{||}Laboratoire de Nanotechnologies Pharmaceutiques, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal H3T 1J4, Canada

ABSTRACT: Curcumin, a neuroprotective agent with promising therapeutic approach has poor brain bioavailability. Herein, we demonstrate that curcumin-encapsulated poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) 50:50 nanoparticles (NPs-Cur 50:50) are able to prevent the phosphorylation of Akt and Tau proteins in SK-N-SH cells induced by H₂O₂ and display higher anti-inflammatory and antioxidant activities than free curcumin. PLGA can display various physicochemical and degradation characteristics for controlled drug release applications according to the matrix used. We demonstrate that the release of curcumin entrapped into a PLGA 50:50 matrix (NPs-Cur 50:50) is faster than into PLGA 65:35. We have studied the effects of the PLGA matrix on the expression of some key antioxidant- and neuroprotective-related genes such as APOE, APOJ, TRX, GLRX, and REST. NPs-Cur induced the elevation of GLRX and TRX while decreasing APOJ mRNA levels and had no effect on APOE and REST expressions. In the presence of H₂O₂, both NPs-Cur matrices are more efficient than free curcumin to prevent the induction of these genes. Higher uptake was found with NPs-Cur 50:50 than NPs-Cur 65:35 or free curcumin. By using PLGA nanoparticles loaded with the fluorescent dye Lumogen Red, we demonstrated that PLGA nanoparticles are indeed taken up by neuronal cells. These data highlight the importance of polymer composition in the therapeutic properties of the nanodrug delivery systems. Our study demonstrated that NPs-Cur enhance the action of curcumin on several pathways implicated in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). Overall, these results suggest that PLGA nanoparticles are a promising strategy for the brain delivery of drugs for the treatment of AD.

KEYWORDS: nanoformulation, curcumin, oxidative stress, tau hyperphosphorylation, neuroprotective genes



INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common forms of dementia.¹ Because of the aging of the population, AD has become one of the most severe, progressive, socio-economical and medical burden all over the world.² The current treatment can cause severe side effects, which often cause the discontinuation of these pharmacotherapies.³ Moreover, only 25–50% of patients respond to these therapies.⁴ Therefore, the development of novel strategies to treat AD remains a great challenge.

The pathophysiology of AD is multifactorial and implicates the deregulation of numerous molecular pathways such as the β -amyloid cascade, tau-phosphorylation, inflammation, and oxidative stress in the brain.⁵ Indeed, it is well established that oxidative stress can induce neuronal cell death and

neurodegeneration.^{6–8} 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.^{9–11} This notion is strengthened by data obtained from transgenic mice models of AD.¹²

Curcumin is a hydrophobic polyphenolic compound widely considered as an effective therapy for several pathological conditions including asthma, epilepsy, gall stone, diabetic wound healing, and cancer.¹³ The hypothesis of a potential

Received: August 7, 2015

Revised: October 27, 2015

Accepted: November 30, 2015

Published: November 30, 2015

therapeutic application of curcumin in dementia originates from epidemiological data and thereafter experimental data that point out its antioxidant, antiinflammatory, and neuroprotective properties. Synoptically, because of pleiotropic actions of curcumin, several actual and ongoing clinical trials deal with the overall action of curcumin or derivatives for numerous applications including neuroprotection. Accumulating data have demonstrated its neuroprotective property through antioxidant, anti-inflammatory, anti-amyloid, anti-tau hyperphosphorylation, and metal chelation activities^{14–17} (also see review in ref 18). We have recently demonstrated that curcumin protects neuronal cells against acrolein-induced toxicity by reducing the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and modulating some redox-sensitive proteins and survival pathways.^{19–21} Therefore, curcumin has the potential for the treatment of AD. In clinical trial, in respect to AD, it appears to be safe and tolerable with no adverse chronic effect until the high dose of 4 g/day during 6 months.²² 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 bioavailability caused by the high hydrophobicity of the molecule. Thus, to enhance its solubility and stability, we have encapsulated this compound into biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA 65:35) nanoparticles with a ratio of 65% of lactic acid (LA) and 35% of glycolic acid (GA) (NPs-Cur 65:35).²³

PLGA has been extensively studied for the development of drug carriers and delivery systems.²⁴ Moreover, it has currently been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for human use (see review in ref 25).

We found that NPs-Cur 65:35 displayed suitable delivery properties, for example, small size, high encapsulation efficiency, prolonged release features in our physicochemical conditions, prolonged antioxidant activity, no toxicity, and high neuronal uptake of curcumin with a wide intracellular distribution.²³ More interestingly, curcumin activities were preserved after at least 6 months of storage.²³

The architecture of nanocarriers not only depends on the nature of compounds to be encapsulated, but also depends on the properties of the polymer and on targeted cells. The ideal matrix should allow low polymeric accumulation and an adequate *in vivo* release profile enabling a minimal drug concentration to be maintained for sustainable effect. Therefore, the choice of a polymeric matrix is indeed of great importance when encapsulating and delivering a drug. For instance, the hydrophilicity is known to influence the kinetic of the degradation of the polymeric matrix. In the case of PLGA, its hydrophilicity decreased when the LA:GA ratio increased. Thus, the kinetic of the PLGA degradation followed this order PLGA 65:35 > 75:25 > 85:15.²⁶ Another important parameter to consider when formulating nanoparticles is the intrinsic physicochemical nature of the compound to be encapsulated. Previously, we had chosen PLGA 65:35 based on its high entrapment efficiency of curcumin, a highly hydrophobic drug. However, another important parameter to investigate is the ability of the matrix to control the kinetic of the drug release in regard to sink condition and better improve the overall efficiency of our nanosystem. The aim of this study was to get further insight into the property of NPs-Cur to better understand the effect of intrinsic polymer modifications on the activity of entrapped drug. By using PLGA 50:50, we found that NPs-Cur also preserved and enhanced the neuroprotective activity of curcumin by modulating survival networks such as

NF- κ B, Nrf2, and synaptic activity with Akt and Tau phosphorylation, all of which are implicated in the pathogenesis of AD. Moreover, we found that NPs-Cur can upregulate the expression of some stress-related genes affected during neurodegenerative diseases such as apolipoprotein E (*APOE*), apolipoprotein J (*APOJ*), thioredoxine (*TRX*), glutaredoxine (*GLRX*), and Repressor Element-1/Neuron-Restrictive Silencing Element (*RE-1/NRSE*) REST. We found that NPs-Cur 50:50 were better than free curcumin and NPs-Cur 65:35 in counteracting the increase of *REST* and *GLX* expressions.

Overall, these results provide a new insight into the neuroprotective activity of NPs-Cur and its development as an effective nanomedicine strategy for the treatment of AD. This confirms and opens a new insight in the development of more sophisticated formulations, such as ligands decorated nanocarriers for the active targeting of the brain.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Curcumin, PLGA 50:50 (MW = 30–60 kDa) and 65:35 (MW = 40–60 kDa), dimethylammonium bromide (DMAB), dialysis bag (12 kDa), bovine serum albumin (BSA), hydrogen peroxide (H₂O₂), minimal essential medium Eagle (MEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, sodium pyruvate, and antirabbit were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). PLGA (50:50) nanoparticles loaded with 1 wt % of the fluorescent dye Lumogen Red (NPs-Lumogen) were prepared as described previously²⁷ and stabilized by 0.1 mg/mL of BSA. Ethyl acetate was purchased from Fisher (Ottawa, ON, Canada). 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) was from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Nuclear protein extraction kit was from Active Motif (California, USA). The bicinchoninic acid (BCA) protein estimation kit was from Pierce Biotechnology (Rockford, USA). All chemicals were of analytical grade and used without further purification. Milli-Q water was used for all the experiments. Rabbit polyclonal antiphospho-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 κ B p50 antibody was from Delta Biolabs (Gilroy, CA, USA). Rabbit polyclonal anti-pTau (ser 214) antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA). Mouse monoclonal anti-GAPDH antibody was from Chemicon (Millipore, Mississauga, ON, Canada). Rabbit and mice horseradish peroxidase (HRP) were obtained from Sigma-Aldrich, Inc. Fluorescence emission with different probes was recorded using Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader.

Methods. Preparation of NPs and NPs-Cur. NPs-Cur formulations were prepared by an emulsion-diffusion-evaporation method, as previously reported.²³ Briefly, curcumin and polymer were dissolved in ethyl acetate (9 mL). Then this organic phase was added to an aqueous phase (17.5 mL) containing DMAB stabilizer (1% w/v) to form an emulsion. This emulsion was stirred and homogenized (Polytron PT4000; Polytron Kinematica, Switzerland) to reduce droplet size. Then the emulsion was further diluted with ultrapure water (132 mL) for solvent diffusion and then subsequently evaporated to remove the organic phase under reduced pressure. NPs-Cur were prepared at a 15% (curcumin/polymer) weight ratio. For the formulation of blank NPs, the same procedure was followed without curcumin.

Nanoparticles were thereafter purified by three cycles of centrifugation (20 000g)/resuspension in ultrapure water.

Physicochemical Characterization of Nanoformulations. Particle Size and Zeta Potential. Dynamic light scattering (DLS) was used for the measurement of average hydrodynamic diameters and the polydispersity index (PDI) of NPs and NPs-Cur. Measurements were performed using a Zetasizer from Malvern Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK. Effective mean diameter of the nanoparticles was obtained from three runs for three different samples. Zeta potential data were measured through electrophoretic light scattering (ELS, 20 °C, 150 V) in triplicate for each sample (Malvern Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK). For both DLS and ELS measurements, water was taken as the dispersant medium.

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 drop (100 μ L) of NPs or NPs-Cur was placed on a copper grid and air-dried. The grid was then immersed in water, air-dried, and then stained by adding one drop of 3% (w/v) phosphotungstic acid (PTA). Then the grid was air-dried before loading in the microscope and photographed.

Entrapment and Drug Loading Efficiency of NPs-Cur. The percentage of drug incorporated during NPs-Cur preparation was determined using a UV-vis spectrophotometer at the wavelength of 420 nm. After centrifugation of NPs-Cur resuspended with acetonitrile, analyses were performed on supernatants. The efficiencies were calculated using the following equations:

Entrapment Efficiency (%)

$$= (\text{Weight of drug into nanoparticles} / \text{initial weight of drug}) \times 100$$

Drug Loading Efficiency (%)

$$= (\text{Weight of drug into nanoparticles} / \text{Weight of produced formulation}) \times 100$$

Mean values were reported from three individual experiments.

In Vitro Release Studies. For *in vitro* release study, purified NPs-Cur were freely dispersed in sodium phosphate buffer (pH 7.4, 30 mL). The release medium was supplemented with 3% w/v BSA as a natural solubility enhancer to maintain sink conditions for the lipophilic curcumin.²⁸ All samples were kept at 37 °C under magnetic stirring and away from light. At various predetermined end points, 1 mL aliquots were collected and centrifuged immediately (20 000g for 30 min at 4 °C) to quantify the exact amount of curcumin in the supernatant at each time. The samples were then analyzed by using a UV-vis spectrophotometer at the wavelength of 436 nm in the presence of BSA, which induces a shift of the absorbance from 420–436 nm.²⁹ The concentration of curcumin released from the NPs-Cur was expressed as a percentage of the total curcumin loaded into the NPs-Cur and was plotted as a function of time.

Antioxidant 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 a colorimetric method.³⁰ Twenty microliters of samples (0.5 μ M) were mixed with 200 μ L of DPPH solution (0.2 mM in 80% 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. A solution containing 80%

ethanol was used as a control. The radical scavenging capacity of the tested samples was measured using the following equation: Radical scavenging activity (%) = $[(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$. 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 a fluorescent probe according to previous reports^{31,32} with slight modifications. Twenty-five microliters of antioxidant [Trolox (1–8 μ M) or sample (Cur, NPs and NPs-cur at 0.5 μ M)] was mixed with 150 μ L of fluorescein and incubated at 37 °C for 15 min. Then 25 μ L of AAPH was added 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. Trolox and 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) solutions were freshly prepared, and fluorescein was diluted from a stock solution (1.17 mM) in 75 mM phosphate buffer. Final ORAC values were expressed as μ mol of trolox equivalent / μ mol of curcumin. Assays were carried out in triplicate for a minimum of three independent experiments.

Culture Assay. Cell Line. SK-N-SH cells, a human neuroblastoma cell line from ATCC (Manassas, VA, USA), were maintained in EMEM, supplemented with 10% (v/v) FBS, 1% penicillin/streptomycin, and sodium pyruvate (1 mM) in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂. Cells were grown to 80% confluence and then seeded into multiwell cell culture plates for the experimental procedures.

Intracellular ROS. Intracellular ROS accumulation was measured by following the oxidation of 2',7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). Briefly, SK-N-SH cells (2 \times 10⁴ cells/well) were plated into 96-well plates and allowed to attach for 24 h. After 24 h, cells were starved and cotreated with free curcumin, NPs, or NPs-Cur and 1.0 mM of H₂O₂ for 1 h. DCFDA was added to a final concentration of 10 μ 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 Fluorescence Microscopy. Curcumin is naturally fluorescent in the visible green spectrum. To study the qualitative cellular uptake of the NPs-Cur, SK-N-SH cells were cultured on coverslips coated with poly-D-lysine at a density of 1.5 \times 10⁴ cells/well in 24-well plates. Cells were incubated for 24 h at 37 °C and then treated with 0.5 μ M free curcumin (used as positive control) or NPs-Cur for 1 h. Cells were then fixed with methanol and the nuclei stained with 1 μ g/mL of DAPI for 15 min.

In another experiment, cells were incubated with fluorescent polymer nanoparticles, NPs-Lumogen, for 4 h at 37 °C. The glass slides were mounted with prolong gold antifade reagent, protected from light, and air-dried. For fluorescence microscopy (Leica ECB, Germany), images were captured using a camera (SensiCam high performance) under the DAPI filter for DAPI detection and the FITC filter for curcumin signal detection. The mean of the intensity of fluorescence per surface unit in each condition was then quantified using the Image-Pro plus 5.0 software (Media Cybernetics, USA), and Log₂ change over nontreated cells was calculated.

Protein Extraction. SK-N-SH cells were treated with 1 mM H₂O₂ and 0.5 μ M free curcumin, NPs, or NPs-Cur for 30 min (Nrf2 and P50) or for 1 h (pAkt, pTau, and Keap1). Total proteins of SK-N-SH cells 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 amounts of protein cell lysates (30 μg) were separated on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (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- κB 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 destained for 30 min in 25% (v/v) isopropanol, acetic acid 10% (v/v). Then membrane was incubated with the secondary antibody HRP-conjugated antirabbit or antimouse (1/10 000) for 1 h. Detection was realized with Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, and the bands were visualized and quantified by densitometric analysis using luminescent imaging system FluorChem.

Gelatin Zymography. SK-N-SH cells were cotreated with 0.5 μM curcumin, NPs, or NPs-Cur and with 1 mM H_2O_2 for 1 h. The supernatants (30 μL corresponding to 1×10^6 cells) were mixed with a 4 \times nonreducing Laemmli's sample buffer (40% glycerol, Tris-HCl 1 M pH 6.8, SDS 8%) and run on 7.5% acrylamide gels containing 2 mg/mL of 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 CaCl_2 5 mM). Gels were stained with Coomassie blue 0.1% and destained.

Gene Expression Analysis by Real-Time PCR (qRT-PCR). Expression of APOE, APOJ, TRX, GLRX, and REST genes by human SK-N-SH neuroblastoma cells was assessed. TRIzol Reagent (Invitrogen, La Jolla, CA) was used to extract total RNA from 1.5×10^6 cells unexposed or exposed to 500 μM H_2O_2 for 4 h. Cells were cotreated with (curcumin, NPs, or NPs-Cur). After extraction, RNA purity and degradation were checked by spectrophotometry using BioSpecnano (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) and capillary electrophoresis using RNA 6000 Nanokit and the Bioanalyzer2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The complementary DNA (cDNA) synthesis was performed with 100 ng of total RNA using the iScriptcDNA synthesis Kit (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France) following the manufacturer's protocol. Gene expressions were determined by qRT-PCR with the iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) in a Stratagene Mx3000p system (Agilent Technologies).

Briefly, 4 μL of each cDNA sample was amplified in a PCR reaction (final volume of 20 μL) containing 10 μL of PCR reagent and 300 nM of each of the two primers (Table 1). For all samples, the following conditions were used: an initial heat-denaturing step at 95 $^\circ\text{C}$ for 5 min followed by 40 cycles of 95 $^\circ\text{C}$ for 15 s, annealing at 60 $^\circ\text{C}$ for 40 s, and elongation and signal acquisition at 72 $^\circ\text{C}$ for 40 s. To confirm the amplification of specific transcripts, melting curve profiles were produced at the end of each reaction, and if two or more peaks were present, the corresponding results were excluded. Water was used as negative control for each PCR run. For each gene, amplifications were performed from three independently prepared samples. Gene expression levels were normalized by comparison to beta-actin (ACTB), used as reference gene. Fold change (FC) of gene expression was calculated by $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method.³³

Statistical Analysis. All data were expressed as means \pm SEM from at least three independent experiments performed at

Table 1. Primers Used for Gene Expression Analysis

genes	primers
ApoE	F: 5'-GGT-CGC-TTT-TGG-GAT-TAC-CT-3' R: 5'-TCC-AGT-TCC-GAT-TTG-TAG-GC-3'
ApoJ	F: 5'-ACA-ATG-AGC-TCC-AGG-AAA-TG-3' R: 5'-TCA-GGC-AGG-GCT-TAC-ACT-CT-3'
GLRX	F: 5'-TCA-GTC-AAT-TGC-CCA-TCA-AA-3' R: 5'-GCA-GAG-CTC-CAA-TCT-GCT-TT-3'
TRX	F: 5'-CAG-ATC-GAG-AGC-AAG-ACT-GC-3' R: 5'-TTG-GCT-CCA-GAA-AAT-TCA-CC-3'
REST	F: 5'-TGC-GTA-CTC-ATT-CAG-GTG-AG-3' R: 5'-CGT-GGG-TTC-ACA-TGT-AGC-TCT-3'
ACTB	F: 5'-TTG-GCA-ATG-AGC-GGT-TCC-3' R: 5'-GTA-CTT-GCG-CTC-AGG-AGG-AG-3'

least in triplicate. Statistical analysis was performed by a Dunnett's test. For Western-blot analysis, one-way ANOVA followed by Tukey test were used. The level of significance was considered when $p < 0.05$.

RESULTS

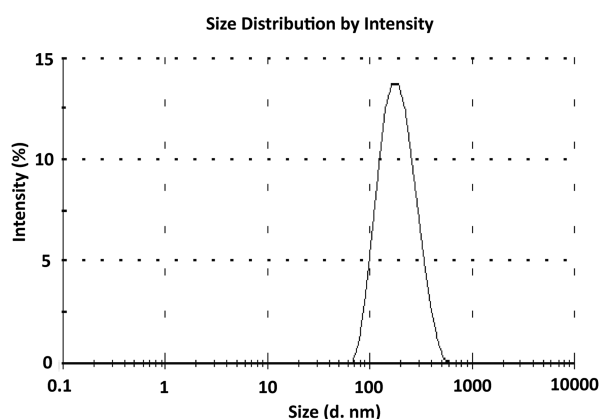
Characterization of NPs 50:50 and NPs-Cur 50:50.

Figure 1, panels A and B show that the mean particle sizes, as determined by DLS, were 131 ± 11 nm and 101 ± 4 nm for NPs 50:50 and NPs-Cur 50:50, respectively (Figure 1C,D). TEM was used to confirm the nanoparticles size and determine the spherical morphology of both nanoparticles. The morphology of NPs 50:50 and NPs-cur 50:50 did not differ from that of NPs 65:35 and NPs-Cur 65:35. A smaller size was observed by TEM than by DLS due to the state of the polymeric matrices, which were hydrated in the case of DLS (hydrodynamic diameters) and dried in the case of TEM. Samples prepared from PLGA 65:35 were more polydisperse than those obtained from PLGA 50:50 (Table 2). Zeta potential values were all positive, irrespective of the drug loading in opposite to what is generally observed with PLGA matrices. This phenomenon was linked to the residual tensioactive at the NP surface and was exacerbated when drug was actually present in the formulation (Table 2). This also suggests that a portion of the drug was associated with the NP surface. 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 initial drug loading represents 15% (15 mg of curcumin/100 mg polymer) for both formulations. The entrapment efficiency of curcumin in Nps-Cur 50:50 was determined to be $27 \pm 2\%$, which is lower than Nps-Cur obtained from PLGA 65:35, which was $31 \pm 6\%$. Similarly, the final drug loading efficiency tended to be lower with PLGA 50:50 (5.1 ± 2) than with PLGA 65:35 (6.9 ± 3).

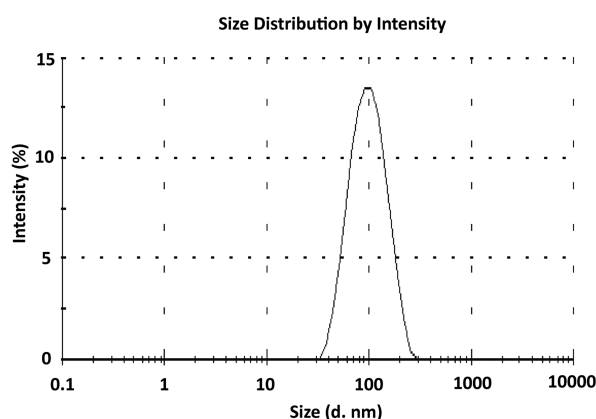
Release Kinetics of Curcumin from NPs-Cur. The *in vitro* release profiles of curcumin from NPs-Cur 50:50 and NPs-Cur 65:35 were studied in phosphate buffer containing 3% BSA at pH 7.4 (Figure 2A). For both formulations, a moderate burst release was noted for the first 5 h, followed by a slower release over 24 h. The release of curcumin from NPs-Cur 65:35 was lower than from NPs-Cur 50:50 reaching 20% and 27%, respectively, after 24 h (Figure 2A).

NPs-Cur Uptake by SK-N-SH Cells. To compare the uptake of curcumin, NPs-Cur 50:50, and NPs-Cur 65:35 by cultured neurons, SK-N-SH cells were incubated with 0.5 μM of free curcumin (control), NPs-Cur 50:50, or NPs-Cur 65:35 for 1 h at 37 $^\circ\text{C}$. Control cells did not display any significant

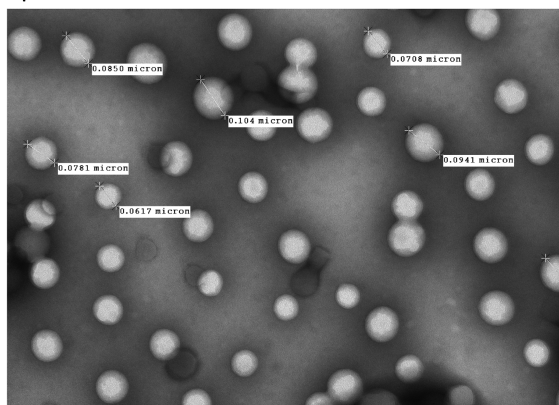
A. Nps-50:50



B. Nps-Cur 50:50



C. Nps-50:50



D. Nps-Cur 50:50

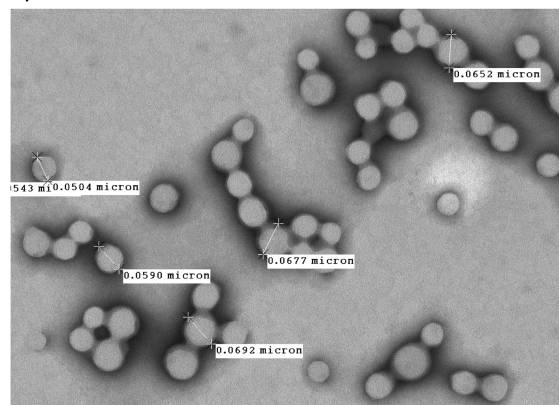


Figure 1. Size distribution and morphological characterization of NPs 50:50 and NPs-Cur 50:50 using dynamic laser light scattering (DLS) and transmission electron micrograph (TEM). DLS analysis of polymeric NPs 50:50 (A) and NPs-Cur 50:50 (B) and TEM photographs of NPs 50:50 (C) and NPs-Cur 50:50 (D).

Table 2. Data on the Particle Size, Drug-to-Polymer Weight Ratio, Entrapment Efficacy, Drug Loading Efficiency, PDI, and Zeta Potential for NPs 50:50, NPs-Cur 50:50, NPs 65:35, and NPs-Cur 65:35 Analyzed by DLS

formulation (<i>n</i> = 3 batches per tested condition)	drug-to-polymer weight ratio (%)	entrapment efficiency (%)	drug loading efficiency (%)	size (d nm)	polydispersity index	zeta potential (mV)
Nps 50:50				131 ± 11	0.30 ± 0.01	6.4 ± 0.3
Nps-Cur 50:50	15	27 ± 2	5.1 ± 2	101 ± 4	0.12 ± 0.03	54.0 ± 2.9
Nps 65:35				148 ± 14	0.25 ± 0.02	16.0 ± 8.2
Nps-Cur 65:35	15	31 ± 6	6.9 ± 3	131 ± 7	0.27 ± 0.02	57.0 ± 3.0

fluorescence, while in the presence of NPs-Cur formulations, cells displayed a clear green fluorescence due to the rapid internalization and accumulation of curcumin inside the cells (Figure 2D,E). The internalization of NPs-Cur formulations was seen primarily in the cytoplasm surrounding the nucleus (Figure 2D,E). Quantitative analysis indicated that the uptake of NPs-Cur 50:50 by SK-N-SH cells was higher than with NPs-Cur 65:35 or free curcumin (Figure 2H). The intracellular green fluorescence corresponds to the fluorescence of curcumin, but it is not clear whether the matrix PLGA is taken up by neuronal cells or not. To analyze whether the PLGA nanoparticles were taken up by neuronal cells, we used PLGA 50:50 NPs loaded with 1 wt % Lumogen Red (NPs-Lumogen). These nanoparticles were demonstrated to be photostable, 10-fold brighter than quantum dots, stable in cell

culture media, and are taken up by HeLa cells via endocytosis process without any cytotoxicity.²⁷ For this purpose, SK-N-SH cells were incubated with NPs-Lumogen for 4 h, and the fluorescence intensity corresponding to the localization of NPs-Lumogen was assessed with the Rhodamine filter (in red). Figure 2, panel F shows the red fluorescence in the vicinity of the nucleus; some fluorescence was observed in the nucleus, but it cannot be excluded that it comes from regions above or below the nucleus. Fluorescence was also observed in the dendrites. Furthermore, the red signal was concentration-dependent, the intensity with 0.3 nM NPs-Lumogen being higher than with 0.2 nM (Figure 2F,G). These results demonstrated that the PLGA NPs could be taken up by neuronal cells and supported the hypothesis that NPs-Cur

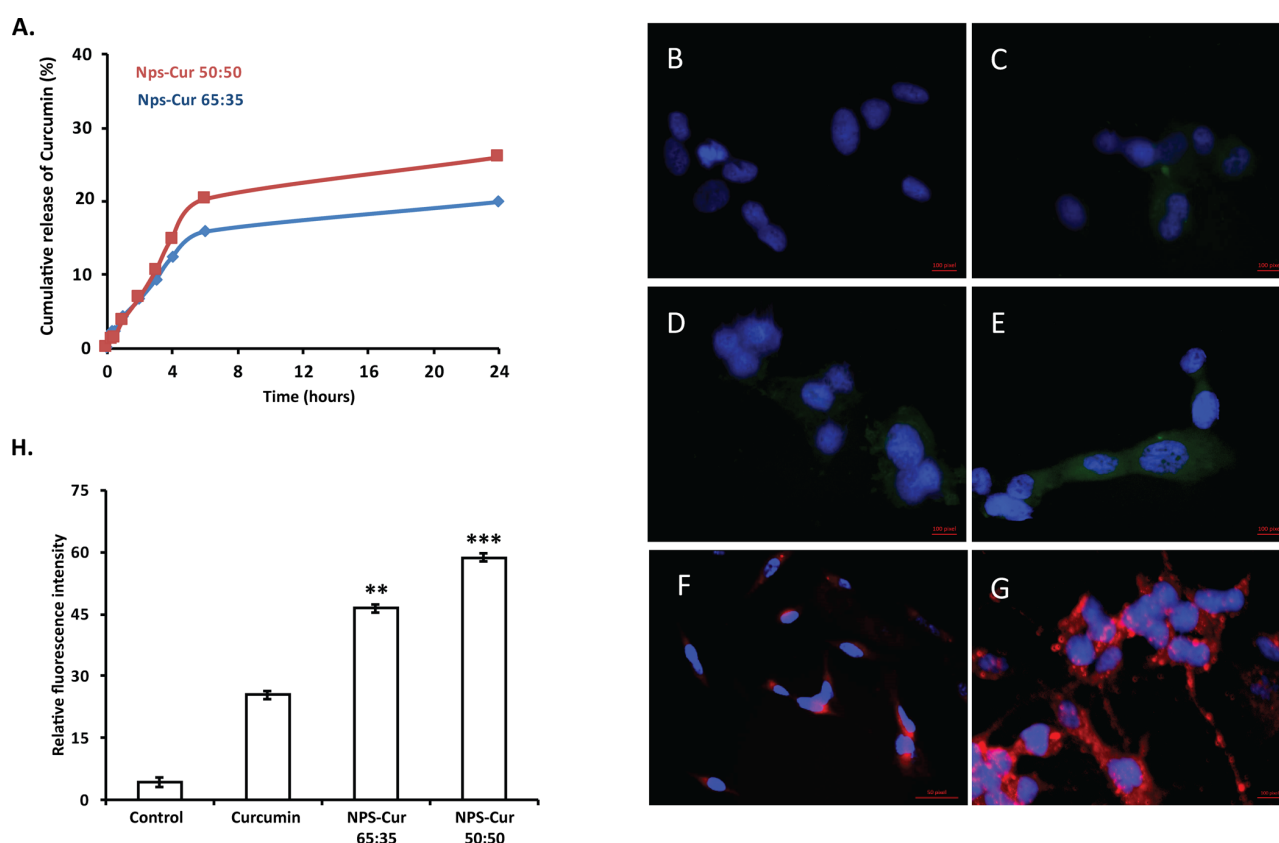


Figure 2. Comparison of *in vitro* release kinetics of curcumin from NPs-Cur 65:35 and NPs-Cur 50:50 in phosphate buffer (pH 7.4, BSA 3%) (A). Fluorescence microscopy imaging of curcumin uptake by SK-N-SH cells. SK-N-SH cells were treated for 1 h at 37 °C with PBS (control, B), free curcumin (C), NPs-Cur 65:35 (D), and NPs-Cur 50:50 (E). Fluorescence of curcumin is observed in green. Lumogen loaded NPs (PLGA 50:50), NPs-Lumogen were used to specify if PLGA nanoparticles are taken up by cells. NPs-Lumogen uptake using fluorescence microscopy is observed in red after an exposure period of 4 h. PLGA internalization is concentration-dependent as observed in panels F and G with, respectively, 0.2 and 0.3 nM of Lumogen. Quantification of the green fluorescence (H) with data representing mean \pm SEM from at least three independent experiments with **, $p \leq 0.01$ and ***, $p \leq 0.001$ indicating a statistical difference versus curcumin treated group.

formulations were effectively taken up by neuronal cells with higher cellular uptake than 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 to free curcumin. Blank NPs 50:50 did not show any free-radical scavenging activity, while free curcumin and NPs-Cur 50:50, at 0.5 μ M, displayed the same antioxidant capacity (25% of DPPH inhibition) (Figure 3A). This property was then confirmed by the ORAC assay, which measures the antioxidant scavenging activity against the peroxy radical produced after the thermolysis of AAPH at 37 °C.³⁶ As shown in Figure 3, panel B, 0.5 μ M NPs-Cur 50:50 displayed 1.5- and 2.2-fold higher antioxidant capacity against peroxy radical than free curcumin and blank 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 curcumin or NPs-Cur 50:50 at three different concentrations (0.07 μ M, 0.25 μ M, and 0.5 μ M) and equivalent concentrations of NPs 50:50. After 1 h of treatment, the intensity of the fluorescence of DCF was significantly reduced for the three different concentrations of free curcumin, NPs-Cur 50:50, and with the highest tested volume of blank NPs 50:50 (Figure 3C). Interestingly, the three tested concentrations significantly reduced the ROS-level

induced by H₂O₂ (Figure 3D). These data strengthened the results obtained on DPPH and ORAC assays and demonstrated that curcumin loaded into NPs-Cur 50:50 retained its antioxidant activity. On the basis of the effect of NPs-Cur 50:50 on DPPH, ORAC, and ROS levels, we 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 cotreated with 1 mM H₂O₂ for 30 min and with 0.5 μ M free curcumin or with an equivalent concentration of NPs-Cur 50:50 or NPs 50:50. In SK-N-SH cells, the activation of Nrf2 by H₂O₂ was prevented in the presence of curcumin, NPs-Cur, and even blank NPs (Figure 4A). Since the activity of Nrf2 is regulated by the inhibitory protein Keap1, we also evaluated the cytoplasmic level of Keap1 in the presence of 1 mM H₂O₂ for 1 h. Accordingly, NPs-Cur 50:50 as well as curcumin also prevented the elevation of the expression of Keap1 induced by H₂O₂ (Figure 4B).

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.³⁷ We have thus analyzed the effect of free curcumin at 0.5 μ M, NPs-Cur 50:50 at 0.5 μ M, and NPs 50:50 with equivalent quantities of curcumin on the levels of gelatinolytic MMPs induced by H₂O₂ in SK-N-SH cells (Figure 5A).

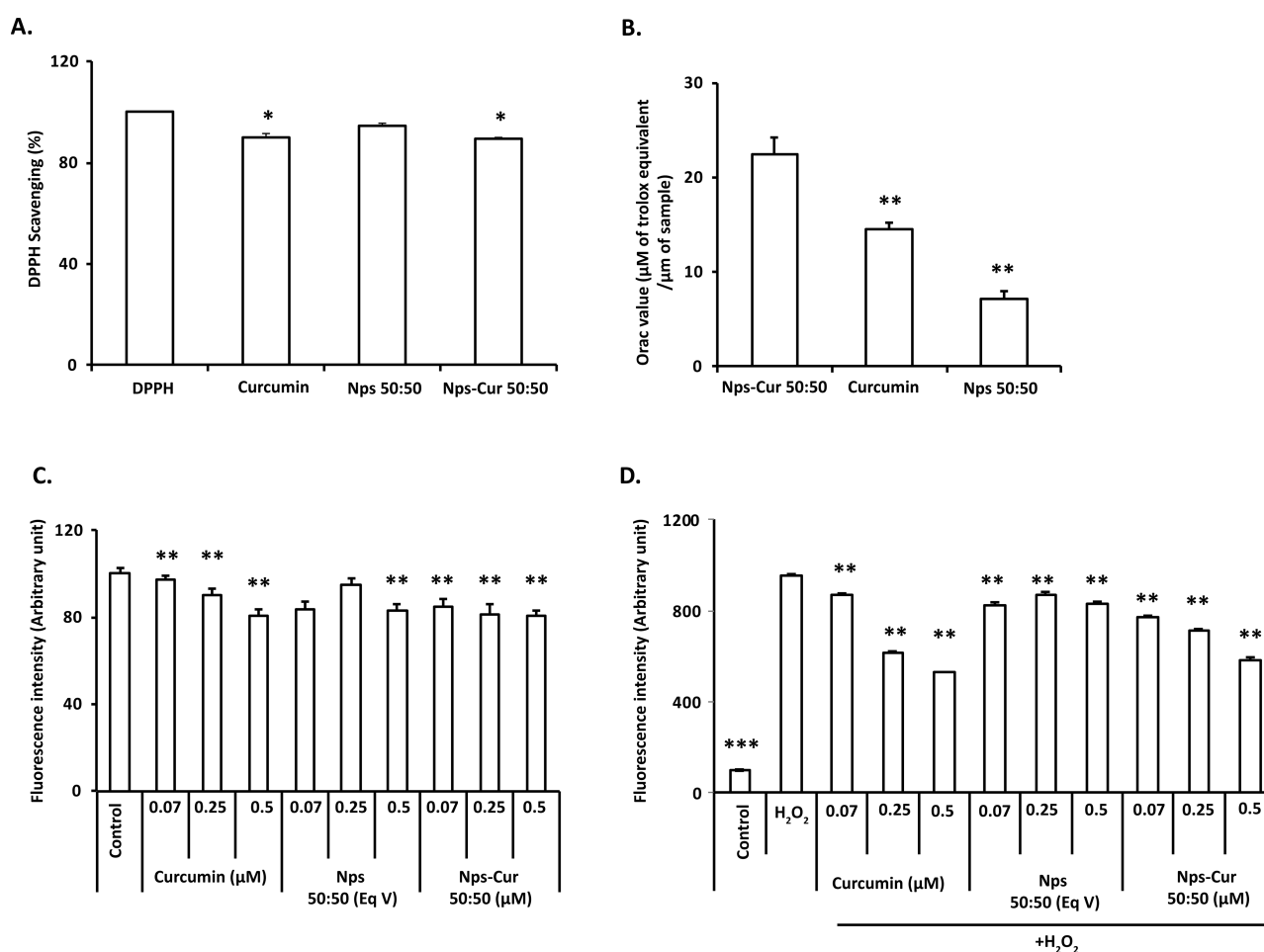


Figure 3. Antioxidant capacity of free curcumin, NPs 50:50, and NPs-Cur 50:50. DPPH radical scavenging activity of 0.5 μM of free curcumin or an equivalent volume of NPs-Cur 50:50 or NPs 50:50 (A); ORAC value performed in the presence of 0.5 μM of free curcumin or an equivalent volume of NPs-Cur 50:50 or NPs 50:50 (B); intensity of DCF-DA analyzed 1h after the treatment of SK-N-SH cells with PBS, different concentrations of free curcumin (0.07 μM , 0.25 μM , and 0.5 μM), or an equivalent volume of NPs-Cur 50:50 or NPs 50:50 in the absence (C) or in the presence of 1 mM of H₂O₂ (D). Results are expressed as percentage of control (considered as 100%). Data represent mean \pm SEM from at least three separate experiments performed in triplicate with *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$ indicating a statistical difference versus control.

Gelatin zymography of the culture media of SK-N-SH cells showed that the release of MMP-9 was inhibited by NPs-Cur 50:50, whereas no effect of curcumin or blank 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- κB pathway by analyzing the cytoplasmic and nuclear expression of the subunit p50 subunit of NF- κB (Figure 5B,C). For this, SK-N-SH cells were cotreated for 30 min with 1 mM H₂O₂ and with 0.5 μM of curcumin or NPs-Cur 50:50 or with an equivalent concentration of NPs 50:50. Curcumin and NPs-Cur reduced the level of the subunit p50 in the cytoplasm and its nuclear translocation induced by H₂O₂.

Effects of Free Curcumin, NPs, and NPs-Cur on pAkt/pTau Pathways. To determine whether Akt pathway is implicated or not 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 H₂O₂ (Figure 6A). Our results also demonstrated that oxidative stress induced the phosphorylation of Tau at the Ser 214.

Interestingly, both curcumin and NPs-Cur 50:50 treatments suppressed this phosphorylation (Figure 6B).

Effects of NPs-Cur on Gene Expression Analysis. The effects of PLGA nanoparticles on the expression of key genes involved in neuroprotection and antioxidant pathways have been poorly studied. We have therefore evaluated the effects of PLGA nanoparticles (50:50 and 65:35) on the expression of *GLRX*, *TRX*, *REST*, *APOJ/Clusterin*, and *APOE*. Our results showed that these genes were constitutively expressed in SK-N-SH cells and not modified by blank NPs after 4 h of treatment. The effect of H₂O₂ on the expression of some of these genes is well-known. For example, both thioredoxin and glutaredoxin were overexpressed after exposure to H₂O₂ and remained elevated for 24 h.³⁸ However, in the presence of curcumin or NPs-Cur, we observed an induction of *GLRX* and *TRX* levels, a decrease of *APOJ* mRNA levels, while the levels of *APOE* and *REST* remain at the initial control expressions (Figure 7). In the presence of H₂O₂, both NPs-Cur (50:50 and 65:35) were more efficient than free curcumin to prevent the induction of the five analyzed genes (Figure 8).

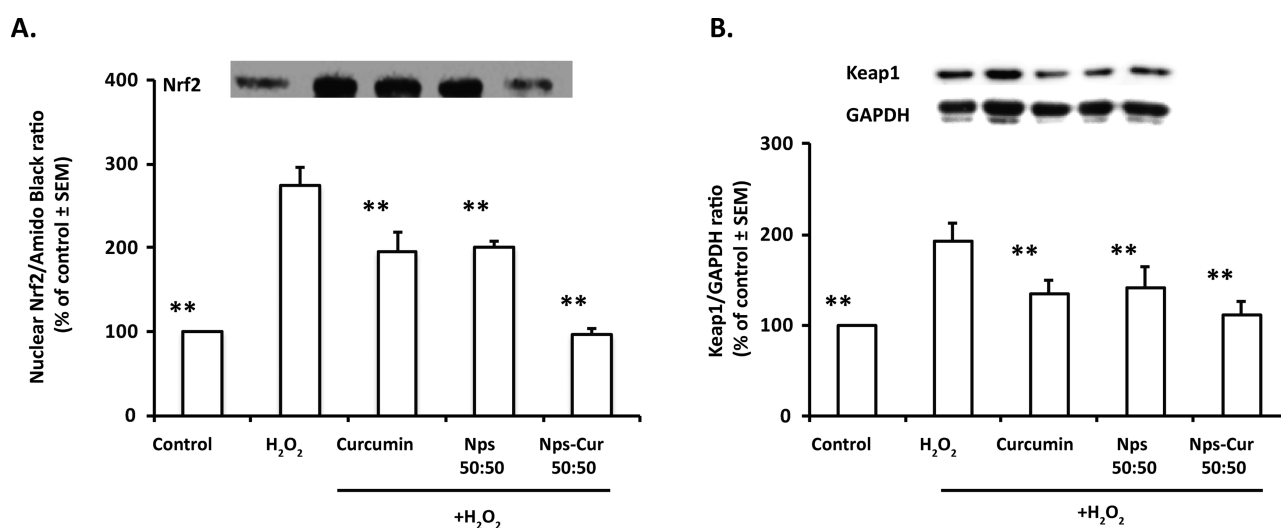


Figure 4. Effects of free curcumin, NPs 50:50, and NPs-Cur 50:50 on the Nrf2 activity. After 1 h of treatment, the level of Keap1 was analyzed on total proteins (A), and Nrf2 levels were also determined on nuclear fraction (B). Blot represents one of the three independent experiments, and bar graph represents quantitative results of the ratio between Keap1 and GAPDH, Nrf2, and amido black. Densitometry analyses were performed on all three experiments, and results are expressed as percentage of control (considered as 100%) with **, $p < 0.1$ versus H₂O₂ treated group.

DISCUSSION

Effective drug delivery to the CNS for the treatment of neurodegenerative diseases such as AD remains a great challenge. Over the past few years, significant breakthroughs have been made in developing suitable PLGA NPs to protect drugs from enzymatic degradation, to increase their bioavailability,^{39,40} and eventually for their delivery across the blood–brain barrier (BBB). Curcumin is one of the most extensively investigated natural compounds for the treatment of AD.¹⁸ Previously, we had successfully encapsulated curcumin in polymeric PLGA nanoparticles with a LA/GA ratio of 65:35 (NPs-Cur 65:35).²³

Nevertheless, the characteristics of the biodegradable polymer strongly impact the degradation and hence the erosion of the matrix. PLGA is a copolymer of D,L-lactic acid (LA) and glycolic acid (GA) with a wide range of LA/GA ratios and molecular weights and therefore can display various physicochemical and degradation properties for controlled drug release applications. Since GA is slightly more hydrophilic than LA, the higher the GA content, the faster the hydrolysis rate. Thus, the LA/GA ratio can modulate the hydrophobicity and crystallinity of the system and therefore the erosion of the matrix, the burst release, and the rate of matrix degradation in cells.

To get further insight into the properties of NPs-Cur, in this study, we have investigated the effect of the polymer PLGA 50:50 on the preservation of the neuroprotective and antioxidant activities of curcumin. We found that both PLGA polymers (50:50 and 65:35) led to nanocarriers with an acceptable size distribution and the similar entrapment and drug loading efficiency. In fact, in this study, we found that the size of curcumin-encapsulated PLGA nanoparticles (50:50) was smaller than that of bare PLGA nanoparticles. This phenomenon was previously reported by several studies where hydrophobic drugs are loaded into PLGA 50:50 matrices.^{23,34,35} In our point of view, blank PLGA nanoparticles display a higher volume due to their higher hydration state, while in the presence of encapsulated curcumin, this hydrated state is decreased due to the presence of a more hydrophobic

core. Moreover, the strong hydrophobic interactions between the PLGA matrix and curcumin could lead to a more structured nanoparticle core, also resulting in smaller nanoparticles. However, NPs-Cur 65:35 was found to be bigger than 50:50 indicating that the polymer ratio of lactic acid/glycolic acid interferes on this parameter. This latter point can be related to the more numerous microcrystalline domains in the case of the 65:35 matrix, leading to a lower aptitude to chain folding during the NP formation and thus to bigger nanocarriers.²⁵

In both cases, the zeta potential was lower in blank NPs than in NPs-Cur indicating the presence of curcumin at the NP surface could be implicated in the nanosuspension stability. We found that the release of curcumin entrapped in the PLGA 50:50 matrix was significantly faster than in PLGA 65:35. This phenomenon could be explained by two parameters: (i) the higher affinity of curcumin for the more hydrophobic PLGA 65:35 matrix could reduce the drug release rate; (ii) the more hydrophilic nature of PLGA 50:50 could lead to a faster and more important diffusion of water molecules inside the nanocarrier matrix and therefore lead to a faster drug release. This could also explain why blank NPs were found bigger, for example, more hydrated than NPs-Cur. Taken together, these results suggest that the composition of the polymer influences NPs formation and drug release through hydrophobic interactions and nanocarrier hydration.

The release kinetics of curcumin was found to be biphasic with a moderated burst effect noted between 0 to 6 h, reaching a maximum release of 15% and 20% for NPs-Cur 50:50 and NPs-Cur 65:35, respectively. This rapid phase corresponds to the surface release of curcumin, as usually observed for this type of PLGA nanocarriers.^{23,25} However, because of the hydrophobic nature of curcumin and despite the presence of a solubility enhancer, this phase was lesser in intensity compared to what is observed for more hydrophilic drug compounds.⁴¹ The second slope depicted a quasilinear behavior after 5 h, which may represent a combination of water diffusion and very slow and gradual erosion of PLGA-matrix. Other studies have reported a release of less than 40% curcumin in 24 h with copolymeric micellar aggregates of NIPAAM and VP.⁴² The

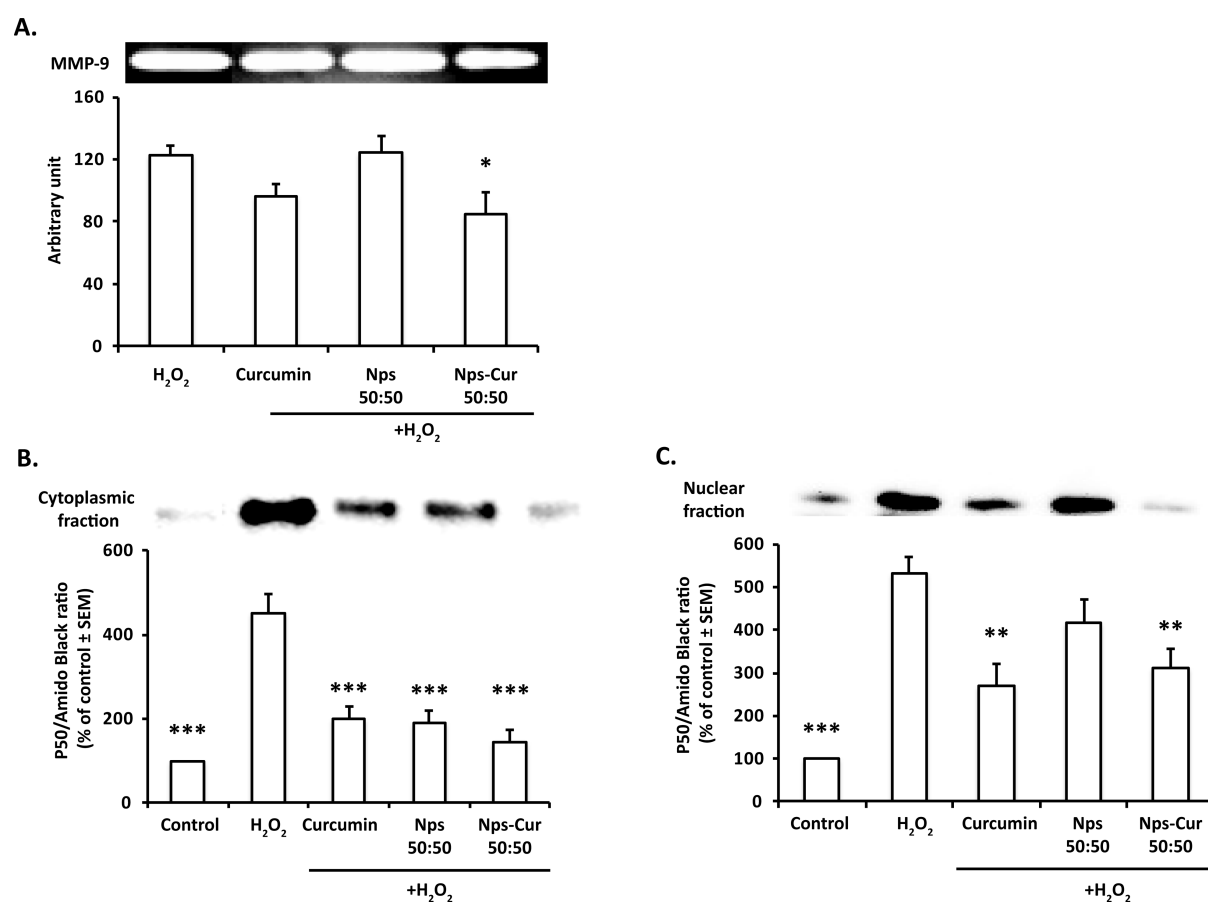


Figure 5. Effects of free curcumin, NPs 50:50, and NPs-Cur 50:50 on the enzymatically active gelatinase induced by H₂O₂. Extracellular release of MMP-9 (gelatinase) was evaluated using gelatin zymography experiments, and densitometry analysis of gelatinase activity is presented (A). Data represent mean \pm SEM from at least three separate experiments with *, $p < 0.05$ indicating a statistical difference versus H₂O₂. Level of the p50 subunit of NF- κ B was also analyzed after 30 min of treatment in the cytoplasmic (B) and nuclear fraction (C). Blot represents one of the three independent experiments, and bar graph represents quantitative results of the ratio 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 H₂O₂ treated group.

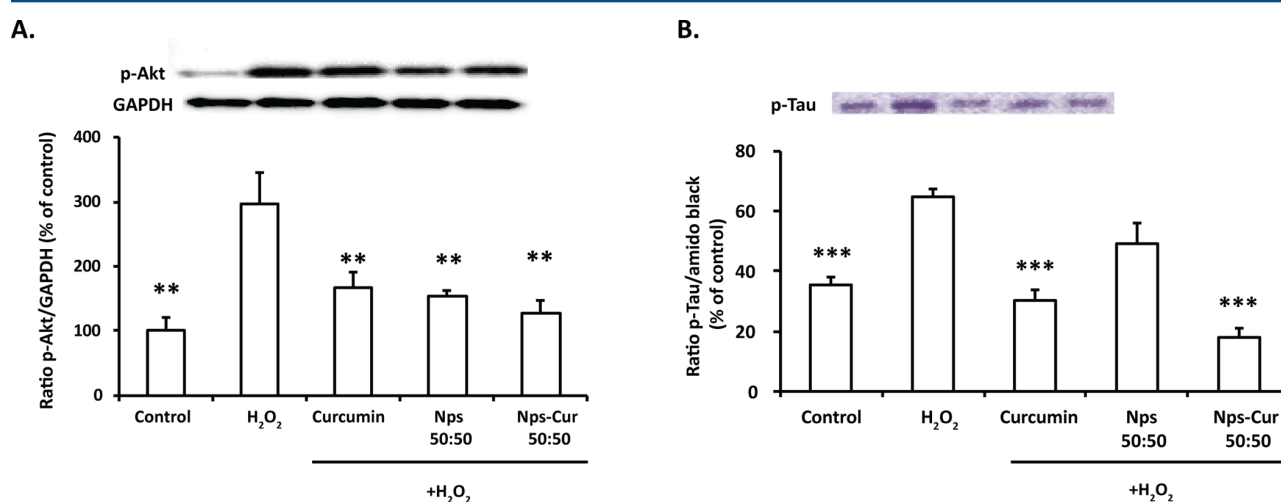


Figure 6. Effects of free curcumin, NPs 50:50, and NPs-Cur 50:50 on Akt and pTau pathways. After 1 h of treatment, the levels of pAkt (A) and pTau (B) were measured on total proteins. Blots represent one of the three independent experiments, and bar graph represents quantitative results of the ratio between pAkt/GAPDH and pTau/amido black. Densitometry analyses were performed on three experiments. Results are expressed as percentage of control (considered as 100%) with **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$ indicating a statistical differences versus H₂O₂ treated groups.

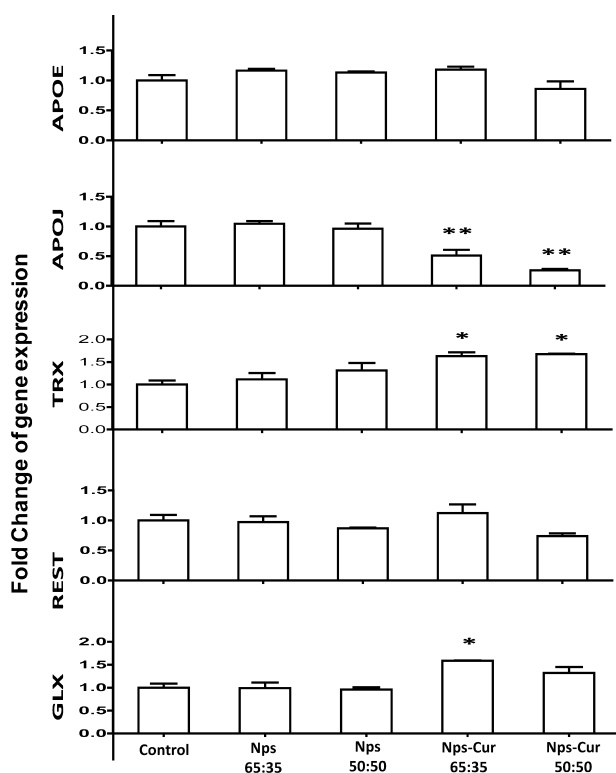


Figure 7. Effect of void nanoparticles on gene expression changes in neuronal cells. SK-N-SH cells were exposed to either PLGA void nanoparticles (50–50 and 65–35) or NPs-Cur. The equivalent volume of formulation required to have $0.5 \mu\text{M}$ of curcumin for each formulation was used to have the same range of polymer concentration. Results were presented as fold change. Data represent mean \pm SEM from at least three separate experiments with *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$ versus control group.

fact that just 20–25% of drug was released after 24 h was very interesting since more than 70% of curcumin was therefore still available for a sustainable effect. Encapsulation of curcumin not only protected it from rapid degradation, but also enabled its slow and sustained release as evidenced in our subsequent experiments through its biological activities. This enabled the formulation to exhibit a much higher protection found after 24 h through counteracting Akt/Tau hyperphosphorylation, oxidative stress, and expression of some related genes than with free curcumin.

Studying the physical drug release, we have previously demonstrated that curcumin release kinetics fits a Higuchi model using ethanol–water. Here, on a system mimicking the physiological *in vivo* conditions, the difference in the release rate observed between NPs-Cur 50:50 and NPs-Cur 65:35 suggested that polymer composition also represents an important factor in the control of the drug release by the nanoparticles. Indeed, it has recently been demonstrated by Fourier transform infrared (FTIR) and X-ray diffraction (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.^{43,44}

Our results on DPPH and ORAC assays demonstrated that the antioxidant properties of curcumin are preserved in PLGA NPs-Cur. Moreover, in ORAC assay, NPs-Cur displayed a

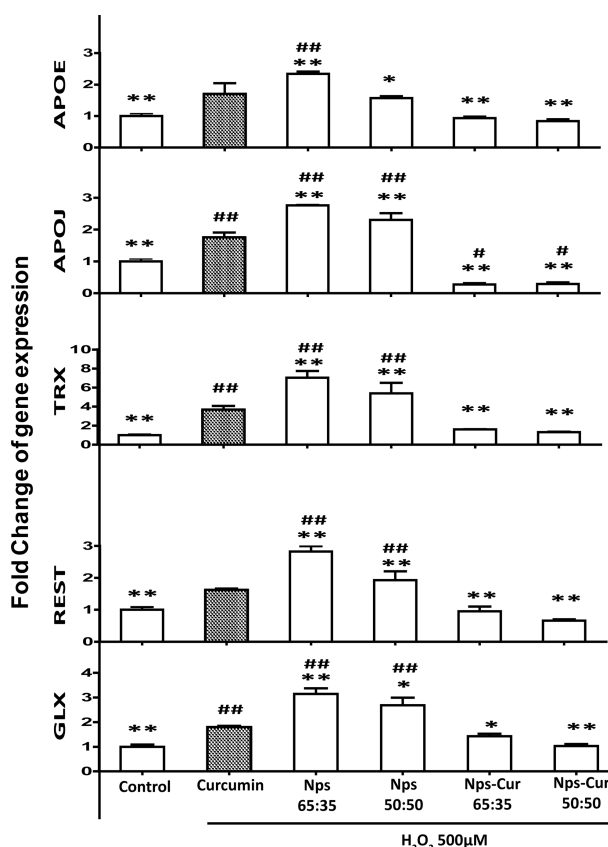


Figure 8. Effect of curcumin encapsulation on gene expression changes in neuronal cells. SK-N-SH cells were exposed to either free curcumin or curcumin loaded NPs (50–50, 65–35) in the presence of $500 \mu\text{M}$ of H_2O_2 . The concentration of curcumin was $0.5 \mu\text{M}$ for each treatment. Results were presented as fold change with *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$ versus free curcumin in the presence of H_2O_2 , while #, $p < 0.05$ and ##, $p < 0.01$ indicate statistical significant values with respect to control samples.

higher peroxy radical scavenging activity as compared to free curcumin. It is interesting to note that blank PLGA NPs displayed an antioxidant activity. The recombination between peroxy free radicals and PLGA chains could reduce ROS level.⁴⁵

To validate the biological activity of NPs-Cur, we have analyzed their effects on three signaling pathways (Nrf2, NF- κ B, and Akt/pTau) involved in the regulation of oxidative stress, inflammation, neuronal survival, and on the phosphorylation of tau protein, which are all relevant in the pathophysiology of AD.⁴⁶ Our results also demonstrated that the property of curcumin on Nrf2 activity is maintained for PLGA 50:50 NPs-Cur and it is similar to PLGA 65:35 NPs-Cur.²³ NF- κ B 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. This can be attributed to the gradual 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- κ B.⁴⁷ Indeed, these data demonstrated that curcumin encapsulated in PLGA

NPs is more potent than free curcumin to inhibit NF- κ B expression.

Akt is a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) signaling pathway. It is directly activated by oxidative stress and is altered in AD brains.⁴⁸ We found that Akt phosphorylation induced by H₂O₂ was observed in parallel with tau phosphorylation likely due to the activation of GSK3 β and its dephosphorylation at the serine 9.⁴⁹ NPs-Cur 50:50, as curcumin, treatments efficiently prevented Akt activity and Tau phosphorylation. These data demonstrated that NPs-Cur preserve the ability to regulate the Akt/GSK3 β pathway and Tau phosphorylation.⁵⁰

Tiwari et al.⁵¹ have recently demonstrated that PLGA NPs-Cur induced the expression of genes involved in cell proliferation, neuronal differentiation by activating the Wnt/ β -catenin pathway. The effects of NPs-Cur on the expression of genes sensitive to cellular redox remain to be analyzed. Therefore, we have studied the effects of PLGA polymers (50:50 and 65:35) NPs-Cur on the expression of APOE, APOJ, TRX, GLRX, and REST. These genes are known to be extremely sensitive to ROS.⁵² For instance, the sequence of APOJ gene contains several putative binding sites for redox-responsive transcription factor including AP1 and Sp1.⁵³ ApoE displays antioxidant,⁵⁴ and ApoE/HDL is well-known to play a crucial role in cholesterol homeostasis in the brain CNS and is involved in neurite outgrowth and synapse formation.⁵⁵ The Trx and the Grx systems are among the key components of the thiol redox buffering system, which is essential for maintaining the balance of the cellular redox status. They play an important role in protecting thiol groups from oxidation and to repair those that may have become oxidized. Grx plays important role in glutathionylation/deglutathionylation reactions. Both systems play an important role in neuroprotection and in AD.^{56,57} REST was found to potentially protect neurons from oxidative stress and is lost in AD.⁵⁸ Blank NPs had no effect on the expression of these genes indicating that the antioxidant activity of blank NPs, on ORAC and DCF-DA assays, is mainly through the direct interaction between peroxyl free radicals and PLGA chains, which inhibit ROS production. The same observation was reported with blank particles on the expression of some genes known to regulate neurogenesis.⁵¹ Interestingly, in normal condition, NPs-Cur can increase the expression of GLRX, TRX, and decrease APOJ genes. In the presence of H₂O₂, NPs-Cur were more efficient than free curcumin to prevent the induction of these genes likely due to higher uptake of NPs-Cur by neuronal cells than free curcumin. This was confirmed with fluorescence microscopy as previously reported.²³ The normalization of the expression of these genes in the presence of PLGA NPs-Cur is in line with their effects on antioxidant pathways.^{59,60}

These results are of great interest because the inductions of these genes are well-known to be representative of cellular damages. Indeed, they are upregulated in neuropathological conditions such as in AD.⁶¹ ApoJ, Trx, and Grx levels increased significantly in MCI and AD patients and are correlated with the levels of phosphorylated tau (p-tau),^{56,62} while the deletion of REST in the brain is associated with age-related neurodegeneration.⁵⁸

We and others have previously demonstrated that curcumin was taken up by neuronal cells following the treatment of SK-N-SH cells with NPs-Cur.²³ However, the demonstration of the uptake of PLGA NPs by neuronal cells is challenging. By using fluorescence microscopy, we demonstrated that the photostable

PLGA-Lumogen NPs were highly taken up by neuronal cells. These results indicate that NPs-Cur are taken up in a concentration-dependent manner by neuronal cells and could release curcumin inside cells, while PLGA is degraded into lactide and glycolide acid and eliminated via the Krebs cycle. NPs uptake could be caveole- or clathrin-mediated endocytosis.^{63–65}

In conclusion, our study demonstrated that curcumin-loaded nanoparticles prolonged and enhanced the antioxidant, anti-inflammatory activity of curcumin while suppressing the Akt and Tau phosphorylation and gene upregulation under oxidative stress conditions. We have also demonstrated the role of the choice of the polymer composition in drug-loaded formulation. Indeed, the ratio of lactic/glycolic acid influences the physicochemical properties of the nanoparticles that will consequently impact on the *in vivo* properties by modulating the entrapment efficiency and the *in vitro* drug release. To summarize, curcumin-loaded PLGA 50:50 formulations are likely to have a greater potential for pharmacological applications and seem to be the best compromise in being used to treat neurodegenerative disorders such as AD.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: Charles.Ramassamy@iaf.inrs.ca. Phone: 1- 450 687-5010.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was obtained from Natural Sciences and Engineering Research Council (to C.R., NSERC), from Louise and André Charron Chair in Alzheimer's disease, and Foundation Universitaire Armand-Frappier-INRS (C.R.) and Conseil Régional de Lorraine (O.J.).

REFERENCES

- (1) Carter, M. D.; Simms, G. A.; Weaver, D. F. The development of new therapeutics for Alzheimer's disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *88* (4), 475–86.
- (2) Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y.; Jorm, A.; Mathers, C.; Menezes, P. R.; Rimmer, E.; Sczufca, M. Alzheimer's Disease, I. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **2005**, *366* (9503), 2112–7.
- (3) Russ, T. C.; Morling, J. R. Cholinesterase inhibitors for mild cognitive impairment. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, *9*, CD009132.
- (4) Giacobini, E. Cholinesterase inhibitor therapy stabilizes symptoms of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2000**, *14* (Suppl 1), S3–10.
- (5) Krstic, D.; Knuesel, I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2012**, *9* (1), 25–34.
- (6) Caldeira, G. L.; Ferreira, I. L.; Rego, A. C. Impaired transcription in Alzheimer's disease: key role in mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *34* (1), 115–31.
- (7) Singh, M.; Dang, T. N.; Arseneault, M.; Ramassamy, C. Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *21* (3), 741–56.
- (8) Christen, Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71* (2), 621S–629S.
- (9) Sultana, R.; Butterfield, D. A. 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), S243–51.

- (10) Smith, M. A.; Zhu, X.; Tabaton, M.; Liu, G.; McKeel, D. W., Jr.; Cohen, M. L.; Wang, X.; Siedlak, S. L.; Dwyer, B. E.; Hayashi, T.; Nakamura, M.; Nunomura, A.; Perry, G. Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *19* (1), 363–72.
- (11) Hudson, G.; Sims, R.; Harold, D.; Chapman, J.; Hollingworth, P.; Gerrish, A.; Russo, G.; Hamshere, M.; Moskvina, V.; Jones, N.; Thomas, C.; Stretton, A.; Holmans, P. A.; O'Donovan, M. C.; Owen, M. J.; Williams, J.; Chinnery, P. F. No consistent evidence for association between mtDNA variants and Alzheimer disease. *Neurology* **2012**, *78* (14), 1038–42.
- (12) Belkacemi, A.; Ramassamy, C. Time sequence of oxidative stress in the brain from transgenic mouse models of Alzheimer's disease related to the amyloid-beta cascade. *Free Radical Biol. Med.* **2012**, *52* (3), 593–600.
- (13) Aggarwal, B. B.; Sundaram, C.; Malani, N.; Ichikawa, H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *595*, 1–75.
- (14) Ringman, J. M.; Frautschy, S. A.; Teng, E.; Begum, A. N.; Bardens, J.; Beigi, M.; Gyls, K. H.; Badmaev, V.; Heath, D. D.; Apostolova, L. G.; Porter, V.; Vanek, Z.; Marshall, G. A.; Hellemann, G.; Sugar, C.; Masterman, D. L.; Montine, T. J.; Cummings, J. L.; Cole, G. M. Oral curcumin for Alzheimer's disease: tolerability and efficacy in a 24-week randomized, double blind, placebo-controlled study. *Alzheimer's Res. Ther.* **2012**, *4* (5), 43. DOI: 10.1186/alzrt146.
- (15) Ryu, E. K.; Choe, Y. S.; Lee, K. H.; Choi, Y.; Kim, B. T. Curcumin and dehydrozingerone derivatives: synthesis, radiolabeling, and evaluation for beta-amyloid plaque imaging. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (20), 6111–9.
- (16) Begum, A. N.; Jones, M. R.; Lim, G. P.; Morihara, T.; Kim, P.; Heath, D. D.; Rock, C. L.; Pruitt, M. A.; Yang, F.; Hudspeth, B.; Hu, S.; Faull, K. F.; Teter, B.; Cole, G. M.; Frautschy, S. A. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *326* (1), 196–208.
- (17) Baum, L.; Ng, A. Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models. *J. Alzheimers Dis.* **2004**, *6* (4), 367–77.
- (18) Belkacemi, A.; Doggui, S.; Dao, L.; Ramassamy, C. Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **2011**, *13*, e34.
- (19) Doggui, S.; Belkacemi, A.; Paka, G. D.; Perrotte, M.; Pi, R. B.; Ramassamy, C. Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57* (9), 1660–1670.
- (20) Dang, T. N.; Arseneault, M.; Zarkovic, N.; Waeg, G.; Ramassamy, C. Molecular regulations induced by acrolein in neuroblastoma SK-N-SH cells: relevance to Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *21* (4), 1197–216.
- (21) Thanh Nam, D.; Arseneault, M.; Murthy, V.; Ramassamy, C. Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2010**, *3* (2), 66–78.
- (22) Baum, L.; Lam, C. W.; Cheung, S. K.; Kwok, T.; Lui, V.; Tsoh, J.; Lam, L.; Leung, V.; Hui, E.; Ng, C.; Woo, J.; Chiu, H. F.; Goggins, W. B.; Zee, B. C.; Cheng, K. F.; Fong, C. Y.; Wong, A.; Mok, H.; Chow, M. S.; Ho, P. C.; Ip, S. P.; Ho, C. S.; Yu, X. W.; Lai, C. Y.; Chan, M. H.; Szeto, S.; Chan, I. H.; Mok, V. Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. *J. Clin. Psychopharmacol.* **2008**, *28* (1), 110–3.
- (23) Doggui, S.; Sahni, J. K.; Arseneault, M.; Dao, L.; Ramassamy, C. Neuronal uptake and neuroprotective effect of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the human SK-N-SH cell line. *J. Alzheimers Dis.* **2012**, *30* (2), 377–92.
- (24) Jain, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* **2000**, *21* (23), 2475–90.
- (25) Makadia, H. K.; Siegel, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel, Switz.)* **2011**, *3* (3), 1377–1397.
- (26) Bala, I.; Hariharan, S.; Kumar, M. N. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2004**, *21* (5), 387–422.
- (27) Trofymchuk, K.; Reisch, A.; Shulov, I.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S. Tuning the color and photostability of perylene diimides inside polymer nanoparticles: towards biodegradable substitutes of quantum dots. *Nanoscale* **2014**, *6* (21), 12934–12942.
- (28) Rigaux, G.; Roullin, V. G.; Cadiou, C.; Portefaix, C.; Van Gulick, L.; Baeuf, G.; Andry, M. C.; Hoeffel, C.; Vander Elst, L.; Laurent, S.; Muller, R.; Molinari, M.; Chuburu, F. A new magnetic resonance imaging contrast agent loaded into poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for long-term detection of tumors. *Nanotechnology* **2014**, *25* (44), 445103.
- (29) Sankar, M. Binding and stability of curcumin in presence of bovine serum albumin. *J. Surface Sci. Technol.* **2007**, *23* (3–4), 91–110.
- (30) Gu, L.; Zhao, M.; Li, W.; You, L.; Wang, J.; Wang, H.; Ren, J. Chemical and cellular antioxidant activity of two novel peptides designed based on glutathione structure. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50* (11), 4085–91.
- (31) Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (10), 4619–26.
- (32) Davalos, A.; Gomez-Cordoves, C.; Bartolome, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (1), 48–54.
- (33) Peirson, S. N.; Butler, J. N.; Foster, R. G. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (14), 73e.
- (34) Boeuf, G.; Roullin, G. V.; Moreau, J.; Van Gulick, L.; Zambrano Pineda, N.; Terryn, C.; Ploton, D.; Andry, M. C.; Chuburu, F.; Dukic, S.; Molinari, M.; Lemercier, G. Encapsulated Ruthenium(II) Complexes in Biocompatible Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Nanoparticles for Application in Photodynamic Therapy. *ChemPlusChem* **2014**, *79* (1), 171–180.
- (35) Roullin, V. G.; Callewaert, M.; Molinari, M.; Delavoie, F.; Seconde, A.; Andry, M. C. Optimised NSAIDs-loaded Biocompatible Nanoparticles. *Nano-Micro Lett.* **2010**, *2* (4), 247–255.
- (36) Cao, G.; Alessio, H. M.; Cutler, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* **1993**, *14* (3), 303–11.
- (37) Candelario-Jalil, E.; Yang, Y.; Rosenberg, G. A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* **2009**, *158* (3), 983–94.
- (38) Chuang, Y.-Y.; Chen, Y.; Gadiseti; Chandramouli, V. R.; Cook, J. A.; Coffin, D.; Tsai, M. H.; DeGraff, W.; Yan, H.; Zhao, S.; Russo, A.; Liu, E. T.; Mitchell, J. B. Gene Expression after Treatment with Hydrogen Peroxide, Menadione, or t-Butyl Hydroperoxide in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 6246–6254.
- (39) Tsai, Y. M.; Chien, C. F.; Lin, L. C.; Tsai, T. H. Curcumin and its nano-formulation: The kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration. *Int. J. Pharm.* **2011**, *416* (1), 331–338.
- (40) Lockman, P. R.; Mumper, R. J.; Khan, M. A.; Allen, D. D. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2002**, *28* (1), 1–13.
- (41) Hill, L. E.; Taylor, T. M.; Gomes, C. Antimicrobial efficacy of poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped cinnamon bark extract against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *J. Food Sci.* **2013**, *78* (4), N626–32.
- (42) Bisht, S.; Feldmann, G.; Soni, S.; Ravi, R.; Karikar, C.; Maitra, A.; Maitra, A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *J. Nanobiotechnol.* **2007**, *5*, 3.
- (43) Xie, X.; Tao, Q.; Zou, Y.; Zhang, F.; Guo, M.; Wang, Y.; Wang, H.; Zhou, Q.; Yu, S. PLGA nanoparticles improve the oral bioavailability of curcumin in rats: characterizations and mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (17), 9280–9.

- (44) Chereddy, K. K.; Coco, R.; Memvanga, P. B.; Ucar, B.; des Rieux, A.; Vandermeulen, G.; Preat, V. Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. *J. Controlled Release* **2013**, *171* (2), 208–15.
- (45) Loo, J. S.; Ooi, C. P.; Boey, F. Y. Degradation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA) by electron beam radiation. *Biomaterials* **2005**, *26* (12), 1359–67.
- (46) Mattson, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **2004**, *430* (7000), 631–9.
- (47) Buhrmann, C.; Mobasher, A.; Busch, F.; Aldinger, C.; Stahlmann, R.; Montaseri, A.; Shakibaei, M. 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), 28556–66.
- (48) Jimenez, S.; Torres, M.; Vizuete, M.; Sanchez-Varo, R.; Sanchez-Mejias, E.; Trujillo-Estrada, L.; Carmona-Cuenca, I.; Caballero, C.; Ruano, D.; Gutierrez, A.; Vitorica, J. 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), 18414–25.
- (49) Feng, Y.; Xia, Y.; Yu, G.; Shu, X.; Ge, H.; Zeng, K.; Wang, J.; Wang, X. 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), 234–42.
- (50) Ma, Q. L.; Zuo, X.; Yang, F.; Ubeda, O. J.; Gant, D. J.; Alaverdyan, M.; Teng, E.; Hu, S.; Chen, P. P.; Maiti, P.; Teter, B.; Cole, G. M.; Frautschi, S. A. Curcumin suppresses soluble tau dimers and corrects molecular chaperone, synaptic, and behavioral deficits in aged human tau transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (6), 4056–65.
- (51) Tiwari, S. K.; Agarwal, S.; Seth, B.; Yadav, A.; Nair, S.; Bhatnagar, P.; Karmakar, M.; Kumari, M.; Chauhan, L. K.; Patel, D. K.; Srivastava, V.; Singh, D.; Gupta, S. K.; Tripathi, A.; Chaturvedi, R. K.; Gupta, K. C. 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), 76–103.
- (52) Trougakos, I. P.; Gonos, E. S. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. *Free Radical Res.* **2006**, *40* (12), 1324–34.
- (53) Zhu, G.; Barrie, A.; Ebert, C.; Rosenberg, M. E.; Witte, D. P.; Harmony, J. A. K. Clusterin gene locus structure and function in development, homeostasis, and tissue injury. In *Clusterin in Normal Brain Functions and during Neurodegeneration*; RG Landes Company, 1999; pp 1–16.
- (54) Ramassamy, C.; Averill, D.; Beffert, U.; Bastianetto, S.; Theroux, L.; Lussier-Cacan, S.; Cohn, J. S.; Christen, Y.; Davignon, J.; Quirion, R.; Poirier, J. Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27* (5–6), 544–53.
- (55) Poirier, J.; Miron, J.; Picard, C.; Gormley, P.; Theroux, L.; Breitner, J.; Dea, D. Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35* (Suppl 2), S3–10.
- (56) Arodin, L.; Lamparter, H.; Karlsson, H.; Nennesmo, I.; Bjornstedt, M.; Schroder, J.; Fernandes, A. P. Alteration of thioredoxin and glutaredoxin in the progression of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2014**, *39* (4), 787–97.
- (57) Mahmood, D. F.; Abderrazak, A.; El Hadri, K.; Simmet, T.; Rouis, M. The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease. *Antioxid. Redox Signaling* **2013**, *19* (11), 1266–303.
- (58) Lu, T.; Aron, L.; Zullo, J.; Pan, Y.; Kim, H.; Chen, Y.; Yang, T. H.; Kim, H. M.; Drake, D.; Liu, X. S.; Bennett, D. A.; Colaiacovo, M. P.; Yankner, B. A. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature* **2014**, *507* (7493), 448–54.
- (59) Lee, Y.; Aono, M.; Laskowitz, D.; Warner, D. S.; Pearlstein, R. D. Apolipoprotein E protects against oxidative stress in mixed neuronal-glia cell cultures by reducing glutamate toxicity. *Neurochem. Int.* **2004**, *44* (2), 107–18.
- (60) Ito, J. I.; Nagayasu, Y.; Ogawa, T.; Okihara, H.; Michikawa, M. Biochemical properties in membrane of rat astrocytes under oxidative stress. *Brain Res.* **2015**, *1615*, 1.
- (61) Desikan, R. S.; Thompson, W. K.; Holland, D.; Hess, C. P.; Brewer, J. B.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; Andreassen, O. A.; McEvoy, L. K.; Hyman, B. T.; Dale, A. M. The role of clusterin in amyloid-beta-associated neurodegeneration. *JAMA Neurol.* **2014**, *71* (2), 180–7.
- (62) Mullan, G. M.; McEneny, J.; Fuchs, M.; McMaster, C.; Todd, S.; McGuinness, B.; Henry, M.; Passmore, A. P.; Young, I. S.; Johnston, J. A. Plasma clusterin levels and the rs11136000 genotype in individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2013**, *10* (9), 973–8.
- (63) Hu, K.; Shi, Y.; Jiang, W.; Han, J.; Huang, S.; Jiang, X. Lactoferrin conjugated PEG-PLGA nanoparticles for brain delivery: preparation, characterization and efficacy in Parkinson's disease. *Int. J. Pharm.* **2011**, *415* (1–2), 273–83.
- (64) Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66* (17), 2873–96.
- (65) Safar, R.; Ronzani, C.; Diab, R.; Chevrier, J.; Bensoussan, D.; Grandemange, S.; Le Faou, A.; Rihn, B. H.; Joubert, O. Human monocyte response to S-nitrosoglutathione-loaded nanoparticles: uptake, viability, and transcriptome. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12* (2), 554–61.

2.4 Conclusion de l'article 1

Dans cet article, nous avons synthétisé et caractérisé les NPs 50:50 afin de comparer leurs propriétés physicochimiques et l'activité neuroprotectrice du curcumin encapsulé à celles des NPs à base de PLGA 65:35.

Dans ce travail, nous avons premièrement montré que l'utilisation d'une matrice à base de PLGA 50:50 optimiserait les propriétés physicochimiques et l'activité biologique. En effet, nous montrons que les formulations à base de ce polymère modulent les tailles des particules, le profil de relargage tout en permettant une meilleure internalisation du curcumin. Une fois les formulations préparées, l'effet de la composition matricielle des NPs sur la viabilité cellulaire a été étudié. Ainsi, nos résultats font ressortir une neuroprotection des Nps-Cur 50:50 contre le stress oxydatif induit par l' H_2O_2 et l'acroléine, un sous-produit de la peroxydation lipidique retrouvé dans le cerveau des patients Alzheimer (Dang *et al.*, 2010; Luo & Shi, 2005; Singh *et al.*, 2010). Les tests de l'ORAC et du DPPH ont montré que les formulations augmentent la capacité antioxydante, ce qui explique en partie l'inhibition de la production intracellulaire des espèces réactives à l'oxygène induit par l' H_2O_2 . Pour ce qui concerne les mécanismes neuroprotecteurs impliqués, les résultats obtenus suggèrent que les NPs-Cur 50:50 empêchent l'induction de la voie Keap1/Nrf2, inhibent l'activation de la voie NF- κ B et ainsi que l'hyper phosphorylation de la protéine Tau induite par l' H_2O_2 . Nous avons également démontré par microscopie que l'encapsulation du curcumin par les Nps-Cur 50:50 augmente l'internalisation du curcumin au niveau du cytoplasme et du noyau comparativement au curcumin libre et aux NPs-Cur 65:35. Plusieurs mécanismes ont été cités dans la littérature pour décrire l'effet de l'encapsulation sur la biodisponibilité des composés encapsulés, notamment la libération prolongée des principes chargés. Nous avons contribué à mettre en évidence la localisation intracellulaire du polymère. Ceci a été fait en utilisant le concept de NPs fluorescentes stables renfermant le *lumogen-red*. Nous avons pu localiser des signaux de

fluorescence dans le noyau, le cytoplasme et les extensions cellulaires des cellules neuronales, attestant l'internalisation des polymères. La présence du curcumin dans le noyau pourrait justifier son effet sur l'expression et l'activation des facteurs de transcriptions impliqués dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif. De plus, nous avons montré que nos NPs-Cur modulent l'expression des gènes de l'APOE, l'APOJ, la TRX, la GLRX, et la REST, aspect jusqu'ici très peu étudié. Finalement, la modulation du ratio acide lactique / acide glycolique affecte la libération du composé encapsulé et apparait donc comme une bonne stratégie pour l'optimisation des nanoformulations.

3 CHAPITRE 3 :

ARTICLE 2

Published in Molecular pharmaceutics

Research Article

Optimization of curcumin loaded-PEG-PLGA nanoparticles by GSH functionalization. Investigation of the neuronal internalization pathway

Djiokeng Paka Ghislain^{a,b} and ***Charles Ramassamy***^{* a,b}

a INRS-Institut Armand Frappier, Laval, Québec, Canada

b Department of Medical Biology, Faculty of Medicine Laval University, Québec, Canada

***Corresponding author** : Professor Charles Ramassamy, INRS-Institut Armand Frappier, 531, boulevard des Prairies, Laval, Québec, H7V1B7, Canada.

E-mail: Charles.Ramassamy@iaf.inrs.ca

Keywords: GSH-functionalized nanoparticles, click chemistry, brain drug delivery, endocytosis, nanoneuropharmacology, oxidative stress, acrolein toxicity

3.1 Résumé de l'article 2

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré les limites de l'application thérapeutique de nombreux principes actifs, potentiellement applicable contre la MA comme le curcumin, en raison de leur faible biodisponibilité. Dans cet article, nous nous sommes proposés de synthétiser des NPs modifiées au GSH, décrire les propriétés physicochimiques des formulations et d'étudier l'effet de la présence du GSH sur l'internalisation neuronale des formulations modifiées.

Les formulations ont été préparées par nanopréciipitation et la modification au GSH à l'aide de la chimie thiol-maléimide. Dans un premier temps, nous avons utilisé la FTIR, la mesure de l'absorbance du maléimide et l'activité antiradicalaire DPPH du GSH résiduelle dans le surnageant afin de confirmer la conjugaison du GSH sur la surface des NPs. Cette conjugaison se traduirait par la formation d'une liaison thioéther (C-S-C). Par la suite, l'effet de la conjugaison sur les propriétés physicochimiques (la taille, la forme, l'efficacité d'encapsulation, et cinétique de libération) a été déterminé comme décrit précédemment dans l'article 1. Par la suite nous avons déterminé l'effet du GSH sur les niveaux d'internalisation neuronale des formulations. L'utilisation d'une matrice fluorescente (présence de la rhodamine fixée sur le PLGA par une liaison covalente) nous a permis de confirmer l'internalisation cellulaire de la matrice conjuguée au GSH. Nous avons par la suite étudié les mécanismes impliqués dans l'internalisation des particules conjugués sur des cellules neuronales prétraitées par différents inhibiteurs d'endocytose. L'effet du GSH sur leurs propriétés neuroprotectrices vis-à-vis de l'acroléine a aussi été déterminé. Nos résultats de caractérisation physicochimique montrent que la présence du GSH ne modifie pas les propriétés physicochimiques des formulations (la taille, la forme, l'efficacité d'encapsulation et le profil de libération des formulations). Une meilleure internalisation neuronale a également été observée en présence des formulations modifiées au GSH. De plus, la présence du GSH s'est avérée favoriser l'internalisation des formulations par des mécanismes d'endocytose

impliquant les clathrines et les cavéoles. Cette étude ressort ainsi l'importance de la conjugaison dans la formulation des nanovecteurs modernes.

3.2 Contribution de l'étudiant à l'article 2

Cet article est en révision dans le Journal "Molecular Pharmaceutics". J'ai défini et mené toutes les expériences de cet article. J'ai effectué la rédaction et les corrections de l'article sous la supervision de mon directeur de recherche. Les soumissions de l'article, et des corrections ont été réalisées par mon directeur de thèse, le Pr. Charles Ramassamy.

3.3 Optimization of curcumin loaded-PEG-PLGA nanoparticles by GSH functionalization. Investigation of the internalization pathway in neuronal cells.

Ghislain Djokeng Paka^{a,b} and Charles Ramassamy^{a,b}*

^aInstitut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand Frappier, Laval, Canada

^bInstitut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels, Laval University, Québec, Canada

*Correspondance to: Charles Ramassamy, PhD,

INRS- Institut Armand Frappier,

531, boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada;

Tel/Fax: +001-450-687-5010, +001-450-687-5510;

E-mail: charles.ramassamy@iaf.inrs.ca

Keywords: GSH-functionalized nanopaticles, click chemistry, brain drug delivery, endocytosis, nanoneuropharmacology, oxidative stress, acrolein toxicity.



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

Djiokeng Paka, Ghislain et Rammassamy, Charles(2017), Optimization of Curcumin-Loaded PEG-PLGA Nanoparticles by GSH Functionalization: Investigation of the Internalization Pathway in Neuronal Cells, Molecular Pharmaceutics, DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00738

SUPPORTING INFORMATION

Supporting information

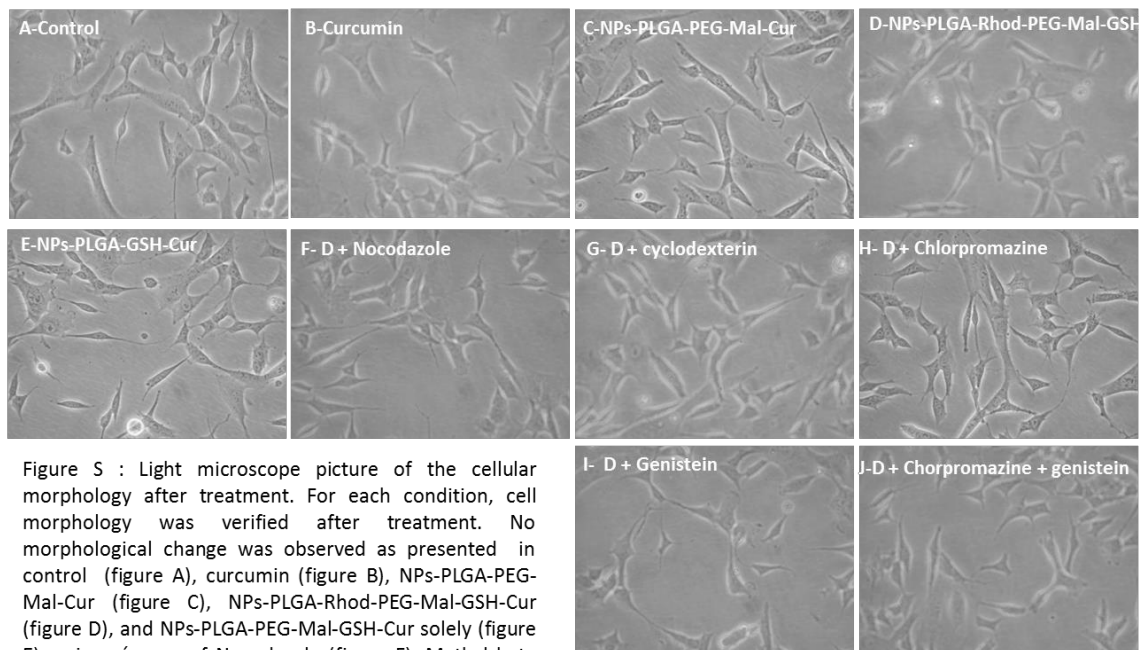


Figure S : Light microscope picture of the cellular morphology after treatment. For each condition, cell morphology was verified after treatment. No morphological change was observed as presented in control (figure A), curcumin (figure B), NPs-PLGA-PEG-Mal-Cur (figure C), NPs-PLGA-Rhod-PEG-Mal-GSH-Cur (figure D), and NPs-PLGA-PEG-Mal-GSH-Cur solely (figure E) or in présence of Nocodazole (figure F), Methyl beta cyclodextrin (figure G), chlorpromazine (figure H), Genistein (figure I) or the mixture of chorpromazine and genistein (figure J). So neither the formulations nor the pharmacological inhibitor affect cell viability,

Light microscope picture of the cellular morphology after treatment (Figure S).

References

- Aoyama K, Suh SW, Hamby AM, Liu J, Chan WY, Chen Y & Swanson RA (2006) Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nature neuroscience* 9(1):119-126.
- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM & Hyman BT (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* 103(1):26-35.
- Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S & Quirion R (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in neurobiology* 68(3):209-245.
- Bareford LM & Swaan PW (2007) Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 59(8):748-758.
- Belkacemi A, Doggui S, Dao L & Ramassamy C (2011) Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. *Expert reviews in molecular medicine* 13:e34.
- Chang CZ, Wu SC, Lin CL & Kwan AL (2015) Curcumin, encapsulated in nano-sized PLGA, down-regulates nuclear factor kappaB (p65) and subarachnoid hemorrhage induced early brain injury in a rat model. *Brain Res* 1608:215-224.
- Chopra A (2004) Transferrin-coated gadolinium-labeled human serum albumin nanoparticles. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*, Bethesda (MD).
- Chopra D, Ray L, Dwivedi A, Tiwari SK, Singh J, Singh KP, Kushwaha HN, Jahan S, Pandey A, Gupta SK, Chaturvedi RK, Pant AB, Ray RS & Gupta KC (2016) Photoprotective efficiency of PLGA-curcumin nanoparticles versus curcumin through the involvement of ERK/AKT pathway under ambient UV-R exposure in HaCaT cell line. *Biomaterials* 84:25-41.

- Conner SD & Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927):37-44.
- Daiello LA, Ott BR, Lapane KL, Reinert SE, Machan JT & Dore DD (2009) Effect of discontinuing cholinesterase inhibitor therapy on behavioral and mood symptoms in nursing home patients with dementia. *The American journal of geriatric pharmacotherapy* 7(2):74-83.
- Diken M, Kreiter S, Selmi A, Britten CM, Huber C, Tureci O & Sahin U (2011) Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation. *Gene therapy* 18(7):702-708.
- Djiokeng Paka G, Doggui S, Zaghami A, Safar R, Dao L, Reisch A, Klymchenko A, Roullin VG, Joubert O & Ramassamy C (2015) Neuronal Uptake and Neuroprotective Properties of Curcumin-Loaded Nanoparticles on SK-N-SH Cell Line: Role of Poly(lactide-co-glycolide) Polymeric Matrix Composition. *Molecular pharmaceutics* 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00611.
- Doggui S, Belkacemi A, Paka GD, Perrotte M, Pi RB & Ramassamy C (2013) Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways. *Molecular nutrition & food research* 57(9):1660-1670.
- Doggui S, Dao L & Ramassamy C (2012a) Potential of drug-loaded nanoparticles for Alzheimer's disease: diagnosis, prevention and treatment. *Therapeutic delivery* 3(9):1025-1027.
- Doggui S, Sahni JK, Arseneault M, Dao L & Ramassamy C (2012b) Neuronal uptake and neuroprotective effect of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the human SK-N-SH cell line. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 30(2):377-392.
- Fang B, Kim JH, Kim MS, Bonakdarpour A, Lam A, Wilkinson DP & Yu JS (2012) Fabrication of hollow core carbon spheres with hierarchical nanoarchitecture for ultrahigh electrical charge storage. *J Mater Chem* 22(36):19031-19038.

- 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(9503):2112-2117.
- Gaillard PJ, Appeldoorn CC, Rip J, Dorland R, van der Pol SM, Kooij G, de Vries HE & Reijerkerk A (2012) Enhanced brain delivery of liposomal methylprednisolone improved therapeutic efficacy in a model of neuroinflammation. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 164(3):364-369.
- Geldenhuis W, Wehrung D, Groshev A, Hirani A & Sutariya V (2014) Brain-targeted delivery of doxorubicin using glutathione-coated nanoparticles for brain cancers. *Pharmaceutical development and technology* (0):1-10.
- Glebov OO, Bright NA & Nichols BJ (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature cell biology* 8(1):46-54.
- Gu L, Zhao M, Li W, You L, Wang J, Wang H & Ren J (2012) Chemical and cellular antioxidant activity of two novel peptides designed based on glutathione structure. *Food Chem Toxicol* 50(11):4085-4091.
- Hewlett LJ, Prescott AR & Watts C (1994) The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *The Journal of cell biology* 124(5):689-703.
- Hillaireau H & Couvreur P (2009) Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66(17):2873-2896.
- Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of biological chemistry* 264(24):13963-13966.
- Ivanov AI (2008) Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol* 440:15-33.

- Katzenmeyer KN & Bryers JD (2011) Multivalent artificial opsonin for the recognition and phagocytosis of Gram-positive bacteria by human phagocytes. *Biomaterials* 32(16):4042-4051.
- Kreuter J (2013) Mechanism of polymeric nanoparticle-based drug transport across the blood-brain barrier (BBB). *Journal of microencapsulation* 30(1):49-54.
- LaFerla FM, Green KN & Oddo S (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience* 8(7):499-509.
- Lindqvist A, Rip J, Gaillard PJ, Bjorkman S & Hammarlund-Udenaes M (2013) Enhanced brain delivery of the opioid peptide DAMGO in glutathione pegylated liposomes: a microdialysis study. *Molecular pharmaceutics* 10(5):1533-1541.
- Liu J & Shapiro JI (2003) Endocytosis and signal transduction: basic science update. *Biological research for nursing* 5(2):117-128.
- Lockman PR, Oyewumi MO, Koziara JM, Roder KE, Mumper RJ & Allen DD (2003) Brain uptake of thiamine-coated nanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 93(3):271-282.
- Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free radical biology & medicine* 23(1):134-147.
- Masserini M (2013) Nanoparticles for brain drug delivery. *ISRN biochemistry* 2013:238428.
- Mathew A, Fukuda T, Nagaoka Y, Hasumura T, Morimoto H, Yoshida Y, Maekawa T, Venugopal K & Kumar DS (2012) Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *PloS one* 7(3):e32616.
- Mercer J & Helenius A (2009) Virus entry by macropinocytosis. *Nature cell biology* 11(5):510-520.

- Molinaro S, Romero MC, Boaro M, Sensidoni A, Lagazio C, Morris M & Kerry J (2013) Effect of nanoclay-type and PLA optical purity on the characteristics of PLA-based nanocomposite films. *J Food Eng* 117(1):113-123.
- Moradi E, Vllasaliu D, Garnett M, Falcone F & Stolnik S (2012) Ligand density and clustering effects on endocytosis of folate modified nanoparticles. *Rsc Adv* 2(7):3025-3033.
- Moreira PI, Carvalho C, Zhu X, Smith MA & Perry G (2010) Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochimica et biophysica acta* 1802(1):2-10.
- Mukherjee S, Ghosh RN & Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiological reviews* 77(3):759-803.
- Nagpal K, Singh SK & Mishra DN (2012) Nanoparticle mediated brain targeted delivery of gallic acid: *in vivo* behavioral and biochemical studies for improved antioxidant and antidepressant-like activity. *Drug Deliv* 19(8):378-391.
- Nam DT, Arseneault M & Ramassamy C (2011) Regulation of Redox-Sensitive Signaling Pathways in Rat Primary Astrocytes Following Acrolein Exposure. *Journal of Alzheimers Disease* 25(2):263-277.
- Nam DT, Arseneault M, Zarkovic N, Waeg G & Ramassamy C (2010) Molecular Regulations Induced by Acrolein in Neuroblastoma SK-N-SH Cells: Relevance to Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimers Disease* 21(4):1197-1216.
- Nam HY, Kwon SM, Chung H, Lee SY, Kwon SH, Jeon H, Kim Y, Park JH, Kim J, Her S, Oh YK, Kwon IC, Kim K & Jeong SY (2009) Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 135(3):259-267.

- Olivier JC (2005) Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2(1):108-119.
- Pang Z, Gao H, Yu Y, Chen J, Guo L, Ren J, Wen Z, Su J & Jiang X (2011) Brain delivery and cellular internalization mechanisms for transferrin conjugated biodegradable polymersomes. *International journal of pharmaceutics* 415(1-2):284-292.
- Rabanel JM, Faivre J, Paka GD, Ramassamy C, Hildgen P & Banquy X (2015) Effect of polymer architecture on curcumin encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: Toward a drug delivery nano-platform to the CNS. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 96:409-420.
- Racoosin EL & Swanson JA (1993) Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *The Journal of cell biology* 121(5):1011-1020.
- Raval N, Mistry T, Acharya N & Acharya S (2015) Development of glutathione-conjugated asiatic acid-loaded bovine serum albumin nanoparticles for brain-targeted drug delivery. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 67(11):1503-1511.
- Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS & Hoekstra D (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *The Biochemical journal* 377(Pt 1):159-169.
- Rigaux G, Roullin VG, Cadiou C, Portefaix C, Van Gulick L, Baeuf G, Andry MC, Hoeffel C, Elst LV, Laurent S, Muller R, Molinari M & Chuburu F (2014) A new magnetic resonance imaging contrast agent loaded into poly(lacide-co-glycolide) nanoparticles for long-term detection of tumors. *Nanotechnology* 25(44).
- Rip CA, F. Manca, R. Dorland, J. Van Kregten, P. Gaillard, (2010) Receptor-mediated delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Pharmacology and Toxicology of*

- the Blood–Brain Barrier: State of the Art, Needs for Future Research and Expected Benefits for the EU (Abstract nr 5464)(
Belgium, 2010,).
- Sahay G, Alakhova DY & Kabanov AV (2010) Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 145(3):182-195.
- Sahni JK, Doggui S, Ali J, Baboota S, Dao L & Ramassamy C (2011) Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 152(2):208-231.
- Sankar M (2007) Binding and stability of curcumin in presence of bovine serum albumin. *J. Surface Sci. Technol.*, 23(No. 3-4,):91-110.
- Song Z, Feng R, Sun M, Guo C, Gao Y, Li L & Zhai G (2011) Curcumin-loaded PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles: Preparation, pharmacokinetics and distribution *in vivo*. *Journal of colloid and interface science* 354(1):116-123.
- Tamaru M, Akita H, Kajimoto K, Sato Y, Hatakeyama H & Harashima H (2014) An apolipoprotein E modified liposomal nanoparticle: ligand dependent efficiency as a siRNA delivery carrier for mouse-derived brain endothelial cells. *International journal of pharmaceutics* 465(1-2):77-82.
- Tiwari SK, Agarwal S, Seth B, Yadav A, Nair S, Bhatnagar P, Karmakar M, Kumari M, Chauhan LK, Patel DK, Srivastava V, Singh D, Gupta SK, Tripathi A, Chaturvedi RK & Gupta KC (2014) Curcumin-loaded nanoparticles potently induce adult neurogenesis and reverse cognitive deficits in Alzheimer's disease model via canonical Wnt/beta-catenin pathway. *ACS nano* 8(1):76-103.
- Tsai YM, Chien CF, Lin LC & Tsai TH (2011) Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration. *International journal of pharmaceutics* 416(1):331-338.

- van der Meel R, Vehmeijer LJ, Kok RJ, Storm G & van Gaal EV (2013) Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status. *Advanced drug delivery reviews* 65(10):1284-1298.
- Wu RH, Nguyen TP, Marquart GW, Miesen TJ, Mau T & Mackiewicz MR (2014) A facile route to tailoring peptide-stabilized gold nanoparticles using glutathione as a synthon. *Molecules* 19(5):6754-6775.
- Xin H, Jiang X, Gu J, Sha X, Chen L, Law K, Chen Y, Wang X, Jiang Y & Fang X (2011) Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles as dual-targeting drug delivery system for brain glioma. *Biomaterials* 32(18):4293-4305.
- Zhang S, Gao H & Bao G (2015a) Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS nano* 9(9):8655-8671.
- Zhang ZY, Jiang M, Fang J, Yang MF, Zhang S, Yin YX, Li DW, Mao LL, Fu XY, Hou YJ, Fu XT, Fan CD & Sun BL (2015b) Enhanced Therapeutic Potential of Nano-Curcumin Against Subarachnoid Hemorrhage-Induced Blood-Brain Barrier Disruption Through Inhibition of Inflammatory Response and Oxidative Stress. *Molecular neurobiology* 10.1007/s12035-015-9635-y.

3.4 Conclusion de l'article 2

L'application des vecteurs modernes pour l'administration des principes actifs dans le SNC nécessite la compréhension et l'optimisation des mécanismes d'internalisation cellulaire impliqués. L'objectif de cet article était de synthétiser et caractériser les GSH-NPS-Cur et étudier l'effet du GSH sur les propriétés physicochimiques et les processus d'internalisation neuronale des formulations ainsi modifiées.

Dans cette étude le PEG a été utilisé à la fois comme «*spacer*» (PEG₃₄₀₀) sur le polymère fonctionnalisé au maléimide (PLGA-PEG-Mal) et comme agent furtif (PEG₂₀₀₀) sur le polymère PEGylé (PLGA-PEG). Il a été montré que l'utilisation des copolymères diblocs classiques comme le PLA-PEG avec une taille des chaînes de PEG entre inférieure à 5000 Da permettrait l'obtention des NPs furtives (Gref *et al.*, 2000).

Dans ce travail, nous avons premièrement synthétisé les NPs modifiées au GSH par nanopréciipitation d'un mélange de polymère (PLGA-PEG-Mal, PLGA-PEG et PLGA) suivant le ratio (1 :1 :1). Nous avons ensuite caractérisé la formation de la liaison thioéther entre le maléimide et le GSH par FTIR. Les modifications structurales causées par la fixation du GSH notamment la présence des bandes de faible intensité caractéristique des liaisons C-S et C-S-C entre 650 et 775 cm⁻¹ ont été détectées. Les résultats ont été confirmés en mesurant l'activité radicalaire du GSH initiale et finale, puis par la mesure de l'absorbance des groupements maléimidyles (302 nm). Nos résultats suggèrent qu'une certaine quantité (environ 30%) de GSH serait impliquée dans la formation de la liaison thioéther à la surface de la formulation.

Une fois les formulations modifiées, la détermination de la taille, la morphologie et des profils de libération du curcumin des différentes formulations a montré que la conjugaison au GSH ne modifie pas les propriétés physicochimiques des formulations. Nous nous sommes par la suite attardés à étudier l'effet de cette conjugaison sur l'internalisation neuronale des formulations. La conjugaison au GSH augmente l'internalisation des formulations et modifie les mécanismes d'endocytose. On note un

changement de la macropinocytose vers un mécanisme dépendant des clathrines et des cavéoles. Nous avons précédemment décrit l'effet neurotoxique de l'acroléine et son implication précoce dans l'apparition de la MA. Nos résultats suggèrent que la présence de GSH sur la surface de GSH-NPs-Cur permet une meilleure neuroprotection vis-à-vis de l'acroléine.

4 CHAPITRE 4 :

DISCUSSION GÉNÉRALE

La MA représente la forme la plus commune des démences. Le vieillissement de la population explique l'augmentation croissante du nombre de patients atteints. Malgré les nombreux efforts consentis dans la recherche des traitements, l'efficacité des molécules proposées est limitée par leurs faibles solubilités et biodisponibilités cérébrales en raison de la haute sélectivité de la BHE. De plus, le développement des stratégies curatives efficaces devrait intégrer l'étiologie multifactorielle de la maladie, et un diagnostic précoce de la maladie. Dans notre laboratoire, nous avons contribué à démontrer l'effet de l'encapsulation des biomolécules sur leur biodisponibilité et leur efficacité biologique.

Par exemple, le curcumin est l'un des composés naturels les plus prometteurs pour des applications dans la MA (Baum *et al.*, 2008; Belkacemi *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2001; Pluta *et al.*, 2015). Au vu de sa faible biodisponibilité et de ses caractéristiques qui permettent une détection simple, nous avons choisi et encapsulé avec succès le curcumin dans des NPs à base du polymère PLGA.

L'objectif de cette thèse a été la mise en place d'un système nanoparticulaire afin d'optimiser l'administration des médicaments dans les cellules neuronales. Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été proposées comme palliatif notamment la synthèse des systèmes nanoparticulaires de ciblage capable de piloter les principes actifs vers un organe, un site ou un type cellulaire déterminé (Andrieux & Couvreur, 2012; Brambilla *et al.*, 2010; Gao, 2016; Garcia-Garcia *et al.*, 2005a; Garcia-Garcia *et al.*, 2005b; Gessner *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2002; Yemisci *et al.*, 2015). Parmi ses systèmes, la littérature pullule sur les NPs de type PLGA (Jain, 2000), en raison de nombreux facteurs tels que la biocompatibilité, la biodégradabilité, la faible toxicité et l'élimination des produits de dégradation par les voies métaboliques normales (Makadia & Siegel, 2011; Shive & Anderson, 1997). Cet aspect a été développé à la section I.2.

Cependant, une meilleure compréhension du rôle de la composition de la matrice polymérique sur les propriétés physicochimiques des formulations de type PLGA, notamment l'effet sur les interactions avec le composé encapsulé permettrait d'optimiser leur devenir biologique. Il est connu que la vitesse d'hydrolyse du polymère est principalement fonction de sa composition, bien que des facteurs secondaires tels que le type d'interaction avec la molécule encapsulée, le poids moléculaire du polymère jouent également un rôle (Garcia *et al.*, 1999; Wang & Wu, 1997). Ainsi, le ratio L/G peut moduler l'hydrophobicité et la cristallinité du système et par conséquent la vitesse de l'érosion de la matrice, qui serait liée à la cinétique de libération des principes actifs dans les cellules (Bertrand *et al.*, 2007). Pour obtenir un éclairage supplémentaire sur la composition matricielle idéale, nous avons, dans un premier temps, étudié l'effet de la modification du ratio L/G sur les propriétés physicochimiques, ainsi que sur la préservation des activités neuroprotectrices et antioxydantes du curcumin. Plusieurs solutions ont été proposées pour améliorer l'application de la nanotechnologie dans le traitement des MNDs. Il a par exemple été montré que l'utilisation des NPs permettait d'augmenter la biodisponibilité cérébrale des molécules encapsulées dans le SNC (Gagliardi *et al.*, 2012). Par exemple, Tsai et ses collaborateurs ont montré que l'administration i.v des NPs chargées de curcumin permettait aux formulations de traverser la BHE et de se retrouver préférentiellement dans le cortex et l'hippocampe, comparativement aux molécules libres (Tsai *et al.*, 2011). En effet le passage d'une molécule de la circulation sanguine à l'intérieur de la cellule neuronale (dans le parenchyme cérébral) est un processus complexe qui implique non seulement la sélectivité de la BHE comme obstacle, mais aussi un certain nombre de mécanismes de transport au niveau neuronal (Lauzon *et al.*, 2015). La deuxième partie de ce travail a consisté à étudier l'effet de la présence d'un ligand comme le GSH; sur l'internalisation neuronale des NPs-Cur.

Dans cette section, nous discuterons tour à tour les méthodes de préparation des NPs utilisées dans cette thèse (EDE et nanopréciptation), de la chimie appliquée dans le processus de conjugaison du GSH ainsi que des techniques de caractérisation de la

liaison covalente (liaison thioéther entre le groupement maléimidyl surfacique et le GSH). Une description des caractéristiques physicochimiques des NPs obtenues sera également fournie. Le mode d'internalisation par les cellules neuronales ainsi que l'effet de la conjugaison sur les mécanismes d'internalisation sera discuté. Nous aborderons aussi la viabilité cellulaire et le devenir biologique des NPs préparées.

4.1 Préparation et conjugaison des NPs

Plusieurs méthodes de préparation des NPs ont été décrites dans la littérature. Idéalement, le choix de la méthode de préparation des NPs dépend non seulement du type de composés à encapsuler et de sa reproductibilité, mais aussi de ses applications ou des questions de recherche posées. Dans ce travail, nous avons utilisé deux méthodes : l'émulsion-évaporation de solvant et la nanoprécipitation. Pour l'étude de l'effet de la composition matricielle, l'EDE a été utilisée pour la préparation des formulations. Plusieurs paramètres importants entrent en jeu lors de la préparation des formulations par EDE, notamment la nature du polymère, le type de surfactant, les conditions d'homogénéisation. Tandis que, lors de la préparation des NPs par nanoprécipitation, il importe de s'assurer de la miscibilité du solvant organique avec la phase aqueuse (le non-solvant) et d'étudier l'effet du solvant sur le polymère.

L'un des objectifs était la formulation de NPs fonctionnalisées au maléimide. Pour cela, nous avons utilisé un mélange de deux ou trois types de polymères (PLGA-PEG₂₀₀₀, PLGA-PEG₃₅₀₀-Mal ou encore PLGA-Rhod). Le PLGA-PEG₂₀₀₀ a été utilisé dans l'optique de permettre une certaine furtivité des particules. Afin de ne pas masquer les groupements maléimides par les PEG₂₀₀₀ présents en surface, nous avons utilisé un PEG₃₅₀₀ comme «*spacer*» sur le polymère fonctionnalisant le PLGA-PEG₃₅₀₀-MAL. Dans cette étude le PEG a été utilisé à la fois pour ses fonctions de masquage de la surface hydrophobe et aussi pour son rôle de bras fonctionnel nécessaire au couplage du GSH. Le PLGA-Rhod a été utilisé pour les expériences visant à localiser la matrice dans les cellules. Compte tenu de la complexité polymérique, la nanoprécipitation a été

utilisée pour cet objectif. La forte capacité d'auto-assemblage des mélanges polymériques par la technique nanoprécipitation permet la préparation assez simple des NPs (Minost *et al.*, 2012). Les NPs sont ainsi obtenues en une seule étape au cours de laquelle les copolymères amphiphiles comme le PLGA-PEG-Mal adoptent une orientation privilégiée avec un cœur de la particule constituée de la partie hydrophobe tandis que les parties hydrophiles (PEG) s'orientent préférentiellement vers l'interface entre le cœur hydrophobe et l'eau (Bouligand *et al.*, 2007). Dans cette étude, la nanoprécipitation a permis la préparation de particule à partir d'un mélange polymérique constitué de PLGA, PLGA-PEG, PLGA-PEG-Mal. Il a déjà été établi que la technique de nanoprécipitation pourrait s'appliquer à la préparation des formulations avec des matrices constituées de deux ou plusieurs polymères (Segura-Sanchez *et al.*, 2010), contrairement à l'EDE.

En se basant sur les formulations qui utilisent des ligands hydrophiles de petite taille et comparables au GSH tel que l'acide folique, l'on peut spéculer que l'utilisation des PEG avec une taille de 3,4 kDa favorisera l'orientation du ligand vers le milieu aqueux (Stella *et al.*, 2007). La conjugaison ajoutera un autre élément susceptible de permettre une certaine spécificité des mécanismes d'internalisation neuronal. Plusieurs ligands sont cités dans la littérature pour leur capacité à cibler le SNC notamment les ligands des récepteurs de la famille des LDLR (ApoE, ApoB, etc), la transferrine et ses dérivées, l'insuline et le GSH pour ne citer que les principaux.

L'avantage indéniable de l'utilisation de petites molécules comme ligands, notamment le GSH, est lié au fait qu'elles permettent de limiter certains problèmes tels que le poids moléculaire élevé, risque plus élevé de réaction immunitaire, le coût de la synthèse et la complexité de la chimie associée aux grosses protéines comme les apolipoprotéines.

Parmi les stratégies de préparations des NPs conjuguées, on peut citer celles qui utilisent des copolymères préformés comportant déjà le ligand. Bien que présentant un rendement de conjugaison plus élevé, sa principale limite est la modification des propriétés physico-chimiques intrinsèques du polymère et du ligand lors de la préparation des formulations (Banquy *et al.*, 2008; Jubeli *et al.*, 2012). Ainsi ces

modifications, parfois irréversibles selon la nature et de la taille du ligand, auraient des conséquences proportionnelles tant sur l'efficacité de chargement que sur la libération du principe actif. On note aussi une incompatibilité parfois liée à la dénaturation du ligand lors de la nanoprécipitation. Il devient donc difficile de prédire l'effet des propriétés physico-chimiques des polymères préformés sur la formulation et par conséquent sur la distribution *in vivo*. Certains auteurs ont simplement proposé l'adsorption du ligand à la surface des molécules (Grover *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2007), la limite ici étant la reproductibilité d'un lot à l'autre et entre les équipes de recherche. L'autre stratégie consiste à la conjugaison ou fonctionnalisation des NPs après leur préparation que ce soit par nanoprécipitation ou émulsion / évaporation (Gref *et al.*, 2003; Stella *et al.*, 2007). La conjugaison du ligand sur des NPs directement offre une meilleure la reproductibilité. Par exemple en jouant sur les ratios de polymères lors de la préparation des NPs, et notamment sur la fraction du polymère fonctionnalisé à ajouter. Il est possible de contrôler le nombre de ligands à la surface des formulations.

De ce fait, Ainsi, dans un premier temps, les nanoparticules ont été préparées en nanoprécipitant un mélange de polymère. Par la suite, la conjugaison par le ligand a été effectuée par une réaction d'hydrothiolation impliquant le maléimide de surface des nanoparticules et la fonction thiol des molécules de GSH. Ainsi, l'utilisation d'un PEG renfermant un groupement maléimide à l'extrémité permettrait de conjuguer des ligands thiolés avec formation des liaisons thioéthers. L'intégration du devenir biologique des nanovecteurs conjugués nécessiterait, lors de la conception, une chimie facilitant la régénération des fonctions -SH du GSH sans perturber le potentiel redox. Une autre alternative serait d'utiliser des PEG thiolés qui réagiraient avec le GSH, conduisant à la formation des liaisons disulfures en milieu basique (pH >7), la principale limitation ici étant le déséquilibre redox cellulaire qui en résulterait. La régénération du GSH par les enzymes du système GR/TRX/TRXR à partir des ponts disulfures est bien documentée. Dans tous les cas, on observe une baisse des niveaux d'expression de ces protéines chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, en vue de caractériser la conjugaison de GSH au groupement maléimide des NPs-PLGA-PEG-Mal, nous avons utilisé plusieurs techniques. La FTIR fournit des informations sur l'environnement des atomes notamment le type de liaisons avec les atomes voisins ainsi que la nature des groupes fonctionnels, permettant ainsi de caractériser l'apparition ou la disparition de nouvelles liaisons. Des études FTIR ont été réalisées afin de caractériser la conjugaison covalente de GSH aux groupes maléimides présents sur la surface de NPs-PLGA-PEG-Mal ou des modifications structurales apparentées. L'analyse a été complétée en mesurant l'activité radicalaire initiale et finale du GSH, puis par la mesure de l'absorbance des groupements maléimide (302 nm). Nos résultats suggèrent qu'une fraction du GSH initial (environ 30%) serait conjuguée au NPs par la formation d'une liaison thioéther. Ce système permet un certain contrôle du GSH de surface comparativement son adsorption à la surface des NPs de PLGA tel que récemment proposé (Grover *et al.*, 2014).

4.2 La caractérisation physicochimique

Depuis l'avènement du concept de nanotechnologie dans le domaine de la chimie médicinale, la caractérisation physicochimique demeure un prérequis incontournable pour leurs applications subséquentes. En effet une meilleure compréhension des propriétés surfaciques (charge, molécule de surface, hydrophobicité) et d'autres propriétés physicochimiques comme la taille, la forme, la composition matricielle permettrait d'optimiser non seulement le devenir biologique mais aussi en amont le choix des méthodes de préparation et de modification surfacique. De nombreux produits médicamenteux approuvés par la FDA comme le Vivitrol, le Zoladex, le Lupron ou la Sandostatine renferment le PLGA. Dans l'organisme, le PLGA est tout d'abord dégradé en sous-unités d'acides lactique et glycolique qui sont facilement éliminées sous forme de CO₂ et d'H₂O via le cycle de Krebs (Mittal *et al.*, 2011). Les propriétés intrinsèques du PLGA, notamment le type d'agencement des L-lactide, mais surtout le ratio L :G a un effet sur la vitesse de dégradation du PLGA (Park, 1994). Par exemple, en raison de sa

plus forte teneur en acide lactique, le PLGA 65:35 permettrait d'obtenir des matrices plus hydrophobes que celles avec PLGA 50:50 ou 25:75.

La DLS, encore appelée spectroscopie par corrélation de photons ou diffusion quasi-élastique de la lumière a été utilisée pour la détermination de la taille des NPs de différentes générations dans cette thèse. Son principe repose sur la mesure d'un mouvement aléatoire ou brownien des particules submicroniques provoquée par l'exposition aux faisceaux lumineux d'un laser. De manière simplifiée, un mouvement brownien rapide traduirait la petitesse de la particule, le coefficient de diffusion des particules étant lié au diamètre hydrodynamique. Pour les formulations obtenues par EDE, nous avons constaté que les deux polymères PLGA (50:50 et 65:35) conduisaient à des formulations avec une distribution de taille, des efficacités d'encapsulation et de charge assez similaires. Nos résultats montrent également une homogénéité de la distribution des tailles, avec un PDI inférieur à 0.3, ce qui traduit une population de taille homogène (monodisperse) tel que décrit dans de nombreux travaux (Su *et al.*, 2016; Waiczies *et al.*, 2015). Notant aussi que suite à la nanopréciipitation et à la conjugaison au GSH, la taille moyenne des NPs obtenues oscille entre 149-180 nm et est également monodisperse. Le développement de NPs monodisperses est essentiel pour les applications biomédicales. Il a été suggéré que la présence de lactate racémique (un mélange 1 :1 des énantiomères L- et D-) sur les polymères purs pourrait générer des domaines microcristallins intrinsèques, réduisant le repliement de la matrice sous elle-même et donc de plus grandes NPs (Makadia & Siegel, 2011). Ce phénomène pourrait en partie expliquer les tailles grandes avec la matrice constituée du polymère 65:35.

Il a également été montré que la présence de certains ligands, comme l'albumine, la transferrine ou les apolipoprotéines, pouvait aussi significativement augmenter la taille des NPs (Chang *et al.*, 2012; Manoochchri *et al.*, 2013; Schaffler *et al.*, 2014). Or nos résultats n'ont montré aucun effet de la conjugaison au GSH sur la taille des particules, certainement en raison de la petite taille du GSH. La taille des NPs affecte considérablement le devenir biologique des formulations. Il a été démontré que les NPs de plus grande taille (au-delà de 200nm) sont facilement captées par la rate. Les

particules de taille supérieure à 1 µm ont tendance à former des embolies. Celles de plus petite taille (6 nm environ) ont tendance à être éliminées par les reins (Choi *et al.*, 2007). La taille des particules aurait également un effet sur le passage à travers la BHE. Dans ce sens, des spéculations situent à 100 nm, la taille idéale, avec un maximum situé à 300 nm (Schroeder *et al.*, 1998).

Pour la plupart des systèmes nanoparticulaires de ciblage, la distribution de taille est généralement importante. Par exemple, une taille moyenne des particules de 200 nm est seulement une description statistique, qui peut dans certains cas se référer à un mélange de particules allant de 50 nm à 400 nm. La réponse des barrières biologiques aux mélanges de particules devient donc difficilement prédictible et reproductible. La mise sur place des protocoles permettant l'obtention d'une population de taille plus homogène, notamment par l'utilisation des filtres, pourrait pallier cette limite.

Un autre paramètre important influençant les interactions NPs-cellules est la mesure du potentiel zêta ou potentiel électrochimique (Kwon *et al.*, 2001). Cette valeur est fonction du polymère utilisé, de la méthode de préparation notamment le type de surfactant utilisé, des modifications de surface (présence d'un ligand ou PEGylation) ainsi que des conditions de mesure. Dans cette étude, nous avons observé des valeurs de potentiel zêta positives pour les formulations préparées par EDE. Les charges positives s'expliqueraient par la présence du DMAB, le surfactant ou tensioactif utilisé lors de la préparation des formulations. Bien que l'alcool polyvinyle (PVA) soit le tensioactif majoritairement utilisé dans la préparation des NPs (Cherreddy *et al.*, 2013), les études utilisant le DMAB, ont montré un net avantage sur le contrôle de la taille et la charge des NPs bien que les mécanismes soient peu élucidés (Hariharan *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2001).

Les potentiels zêtas des NPs conjuguées au GSH ont aussi été mesurés. Les valeurs enregistrées sont faiblement négatives avec une tendance à la neutralité. Gref et ses collaborateurs ont montré une fonction de masquage de la couche de PEG tel que quantifiée par une tendance du potentiel zêta vers la neutralité (Gref *et al.*, 2000; Gref *et al.*, 2001). Des potentiels zêtas négatifs sont souvent retrouvés avec des

matrices constituées de PLGA ou PLA. Ceci confère une charge négative à la surface des NPs (Stolnik *et al.*, 1995). Ceci s'explique par la présence de groupements carboxyles libres sur le polymère provenant des extrémités des chaînes de PLGA. Le potentiel zêta est aussi un marqueur de stabilité des formulations via les interactions électrostatiques. En plus de la charge, plusieurs paramètres sont à considérer, notamment la présence d'un surfactant, le type et la densité des molécules de surface comme le PEG ou des ligands diverses. Dans l'ensemble, les répulsions électrostatiques et stériques sont les principaux acteurs qui régulent les forces d'attraction inter-particulaires, ce qui permet d'éviter leur agrégation, et la formation des embolies.

Le pourcentage d'encapsulation, ainsi que l'efficacité de charge influencent directement l'activité biologique des formulations. On constate aussi que la conjugaison au GSH n'a pas d'incidence sur la charge en principe actif, ni sur l'efficacité d'encapsulation. Tout ceci traduit une très bonne stabilité colloïdale après nanopréciipitation et modification surfacique et tout au long du processus de purification.

La morphologie des NPs est également une autre caractéristique essentielle pour leur exploitation en nanomédecine. La grande majorité des NPs développées pour l'administration de médicaments possède une forme sphérique. Nous avons constaté que la présence de GSH ne modifie pas la morphologie et la taille des particules, ce qui semble logique au vue de la taille de ce tripeptide. L'apparence plus petite des particules en microscopie électronique à transmission par rapport aux tailles obtenues par DLS s'expliquerait par l'état des matrices des formulations utilisées dans chaque cas. La microscopie implique la déshydratation des formulations tandis que la DLS mesure la taille hydrodynamique des particules en suspension dans un milieu aqueux.

Pour ce qui est de la libération contrôlée, un pilier essentiel pour l'application de la nanotechnologie en pharmacologie, l'étude de la cinétique de libération a été menée sur un système représentant les conditions *in vivo* notamment la présence de l'albumine dans un tampon phosphate. Nos résultats de cinétique nous suggèrent que la composition du polymère pourrait jouer sur le profil de la libération du principe actif par

les NPs. De petites variations du profil peuvent se traduire par une modulation de l'effet biologique et pourrait impliquer des interactions hydrophobes du produit encapsulé avec la matrice. L'hydrophobicité est proportionnelle à la teneur en acide lactique (50:50 < 65:35 < 75:25 < 85:15) du polymère (Makadia & Siegel, 2011). Par conséquent, l'intensité des interactions hydrophobes sera fonction de l'hydrophobicité du composé encapsulé (Makadia & Siegel, 2011). En routine, nous utilisons deux méthodes différentes pour l'étude de la cinétique de libération. La première se définirait plus comme une étude de la libération physique du principe actif de la matrice sous l'influence de l'éthanol. La principale limite de ce système est qu'il n'intègre pas des réalités biologiques dans son mode opératoire. Elle est simple, rapide et nous renseigne sur les propriétés physicochimiques d'une formulation. Par cette méthode, nous avons montré le rôle de la composition matricielle sur le profil de libération du curcumin. Dans la deuxième méthode, cet aspect est pris en compte par l'utilisation de l'albumine comme *solubility enhancer* afin de mieux solubiliser le curcumin (Kaur *et al.*, 2015; Rigaux *et al.*, 2014).

4.3 Étude des propriétés neuroprotectrices

Les études *in vitro* sont particulièrement pertinentes pour évaluer la toxicité, l'internalisation des formulations et les mécanismes ainsi que l'efficacité neuroprotectrice du composé encapsulé. Tout au long de cette thèse, nous avons travaillé avec les cellules de neuroblastome humain, les SK-N-SH, initialement proposées par Biedler et ses collaborateurs en 1973 (Biedler *et al.*, 1973). Cette lignée de neurones humains est sensible aux facteurs physiopathologiques clés dans les MNDs. Ainsi, elle serait un modèle cellulaire adapté pour étudier les mécanismes impliquant le stress oxydatif, la toxicité induite par l'A β ainsi que l'activité des enzymes du système nerveux sympathique comme la dopamine- β hydroxylase (Biedler *et al.*, 1973; Biedler *et al.*, 1978; Kovalevich & Langford, 2013).

L'utilisation des formulations nanoparticulaires en neuropharmacologie requiert l'étude de leur neurotoxicité et leur effet protecteur, qui par extrapolation pourraient nous donner des indications sur leur index thérapeutique. Ainsi, nous avons étudié l'effet des formulations sur la viabilité des cellules neuronales. Nos résultats suggèrent que les formulations préparées ne sont pas toxiques. Dans le but de vérifier l'innocuité de nos formulations, des études de toxicité ont été menées, nos résultats montrent que ces formulations sont sans risque à la concentration testée, et donc possiblement applicable *in vitro*. Dans notre équipe, des travaux sont en cours pour l'élaboration d'un protocole d'étude de la toxicité sur des temps d'exposition plus long court.

Dans cette thèse, les mécanismes de neuroprotection du curcumin ont été étudiés. Plus précisément, l'effet de la composition matricielle sur la capacité des formulations à réguler certains marqueurs du stress oxydatif, de l'inflammation, de la survie neuronale et de la phosphorylation de la protéine tau, ces mécanismes étant tous impliqués dans la physiopathologie de la MA (Braak & Braak, 1991; Mattson, 2004; Mattson, 2006). Nos résultats ont montré l'effet de la composition matricielle des formulations sur la capacité du curcumin à réguler la voie Akt / GSK3 β , la phosphorylation de tau, ainsi que l'effet des formulations sur l'expression des gènes sensibles au potentiel redox cellulaire. Très peu de travaux se sont attardés à ce dernier aspect dans la littérature. Nous avons étudié les effets de la composition matricielle (PLGA 50:50 et PLGA 65:35) des formulations sur l'expression de certains gènes antioxydants et neuroprotecteurs à savoir l'apolipoprotéine E (APOE), apolipoprotéine J (APOJ), thioredoxine (TRX), glutaredoxine (GLRX), et la *Repressor Element-1/Neuron-Restrictive Silencing Element* (REST). Le rôle antioxydant de l'ApoE et de l'ApoJ est bien connu (Ramassamy *et al.*, 1999; Trougakos & Gonos, 2006). L'ApoE joue un rôle crucial pour l'homéostasie du cholestérol dans le SNC (Poirier *et al.*, 2014). La Trx et la Grx assurent la régulation des fonctions thiols tandis que la REST joue un rôle dans la protection des cellules neuronales contre le stress oxydatif (Arodin *et al.*, 2014; Mahmood *et al.*, 2013). En effet, ces gènes sont surexprimés dans des conditions neuropathologiques comme la MA. On note une augmentation significative des niveaux d'APOJ, TRX et GRX chez les

patients MCI et Alzheimer qui est corrélée avec les niveaux de la protéine Tau phosphorylée (Arodin *et al.*, 2014; Mullan *et al.*, 2013). Quant à la REST, il a été démontré qu'une diminution de son expression était impliquée dans la neurodégénérescence liée à l'âge (Lu *et al.*, 2014). Ces gènes ont pour point commun leur sensibilité aux espèces réactives de l'oxygène. De notre étude, il ressort que les formulations NPs-Cur (65:35 et 50:50) étaient plus efficaces que le curcumin libre pour empêcher l'induction de ces gènes probablement en raison de l'absorption plus élevée du curcumin encapsulé par les cellules neuronales. Des résultats similaires ont été obtenus par Tiwari et ses collaborateurs qui ont récemment démontré que l'encapsulation du curcumin (PLGA 50:50) induit l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation neuronale en activant la voie / bêta-caténine (Tiwari *et al.*, 2014).

L'effet antioxydant des formulations a ensuite été confirmé en déterminant l'effet de la modification au GSH sur les niveaux de production des EROs. Nos résultats ont confirmé que l'encapsulation du curcumin au PLGA et la modification de surface avec l'ajout du GSH, permettent que le curcumin conserve son activité antioxydante et ses propriétés neuroprotectrices. Une étude avec des temps de traitement plus longs serait également nécessaire afin de mettre en évidence le temps de conservation de l'activité neuroprotectrice du curcumin encapsulé. Par extrapolation, ceci nous renseignerait sur la possibilité de réduire les doses de traitement ainsi que d'obtenir une idée préliminaire sur l'index thérapeutique.

4.4 Internalisation et mécanismes d'internalisation cellulaire des formulations

Dans cette partie, nous avons voulu étudier l'effet de la composition matricielle et de la conjugaison au GSH sur l'internalisation neuronal du curcumin afin d'expliquer les mécanismes neuroprotecteurs observés. Concernant la composition matricielle les images obtenues par microscopie à fluorescence ont montré une meilleure

internalisation avec le PLGA 50:50 comparativement au curcumin tout seul, ce qui explique aussi son meilleur effet sur la normalisation de l'expression de ces gènes. Après modification au GSH, nos résultats montrent la présence d'un signal de fluorescence caractéristique de l'accumulation du curcumin à l'intérieur des cellules et dans les extensions cellulaires. Après une analyse quantitative, nous avons constaté une meilleure internalisation des particules modifiées au GSH. Cependant, ces résultats soulevaient une question fondamentale : le signal vert intracellulaire correspond-il au curcumin libre ou au curcumin encore encapsulé? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des formulations fluorescentes: les NPs de type PLGA 50:50 chargées avec un fluorophore rouge (le lumogène rouge) et un système incorporant la rhodamine dans le mélange polymérique matricielle. Nos résultats démontrent la localisation intracellulaire des particules dans le noyau, le cytoplasme et les extensions dendritiques. De plus, nos résultats démontrent clairement que la matrice conjuguée au GSH est facilement internalisée par les cellules neuronales et que 2 heures après exposition, il y a encore une partie de principe actif dans la matrice intracellulaire. Ceci est cohérent avec un des principes clés de l'encapsulation, celui de la libération graduelle et prolongée des principes actifs et par conséquent un meilleur effet thérapeutique dans le temps.

De nombreux travaux ont démontré que la présence surfacique de certains agents tensio-actifs (PEG ou polysorbate 80), des peptides améliorerait la capacité d'internalisation cellulaire des NPs. Ceci pourrait être expliqué par le fait que ces molécules interagissent avec d'autres ligands *in vivo* et donc permettent d'optimiser l'internalisation par un processus d'endocytose dépendant du type cellulaire. Dans ce sens, il a été montré que les particules d'or modifiées au GSH et chargées négativement peuvent recruter des molécules polycationiques à travers des interactions électrostatiques et ainsi modifier l'internalisation cellulaire (Sousa *et al.*, 2016; Sousa *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2010). Plus spécifiquement, un nombre croissant d'articles a signalé le GSH comme une molécule pouvant augmenter l'internalisation neuronale des formulations (Geldenhuis *et al.*, 2011; Geldenhuis *et al.*, 2015; Grover *et al.*, 2014;

Patel *et al.*, 2013; van der Meel *et al.*, 2013). De plus, certaines études démontrent que l'administration de liposomes conjugués au GSH entraîne une meilleure accumulation des formulations dans le cerveau contrairement à des formulations non modifiées (Holtman *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Lindqvist *et al.*, 2016a; Lindqvist *et al.*, 2016b; Rotman *et al.*, 2015). Cependant, très peu d'informations descriptives existent sur les mécanismes par lesquels la présence de GSH optimiserait l'internalisation neuronale des NPs. Par conséquent, nous avons ensuite étudié les mécanismes d'internalisation neuronale des formulations modifiées au GSH en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques bien connus de différents processus d'endocytose.

L'endocytose est largement citée comme la principale voie d'internalisation des NPs (Decuzzi & Ferrari, 2007; Dombu *et al.*, 2010; Li, 2012; Oh & Park, 2014; Zhang *et al.*, 2009). L'un des facteurs de différenciation qui définit les processus d'endocytose est la nature de la protéine impliquée lors de la formation des vésicules d'internalisation. Ce paramètre gouverne en grande partie le devenir intracellulaire des NPs. Parmi les processus d'endocytose, nous pouvons citer : l'endocytose cavéole dépendante, endocytose clathrine dépendante, la macropinocytose et les processus indépendants des clathrines et cavéoles (El-Sayed & Harashima, 2013; Kiss & Botos, 2009; Mukherjee *et al.*, 1997). L'utilisation des inhibiteurs propres à ces voies d'internalisation nous a permis de faire ressortir que la macropinocytose était plus importante pour l'internalisation des formulations non modifiées au GSH par rapport aux formulations modifiées.

Ceci suggère que la présence du GSH peut aider les formulations à éviter l'internalisation par macropinocytose, une voie d'internalisation non spécifique associée à une probabilité élevée de dégradation lysosomale. En effet, les nanovecteurs qui empruntent cette voie se retrouveraient piégés dans des endosomes précoces qui ont pour fonction de dégrader les particules intravésiculaires inutiles au fonctionnement de la cellule (Weissmann, 1967). Cependant, une bonne fraction des formulations modifiées au GSH serait internalisée par endocytose clathrine et cavéole dépendantes, comme démontré dans cette thèse. Les cavéoles sont particulièrement abondantes

dans les cellules endothéliales, où elles peuvent constituer 10 à 20% de la surface cellulaire (Bareford & Swaan, 2007). De nombreux ligands ont été utilisés pour l'endocytose dépendante des clathrines incluant les ligands de la famille de récepteurs des LDL, de la transferrine et du facteur de croissance épidermique (Hillaireau & Couvreur, 2009). De plus, nos résultats suggèrent que d'autres mécanismes d'endocytose indépendant des clathrines et/ou cavéoles tels que de la flotilline, la RhoA, l'Arf1 ou 6 dépendant de l'absorption peuvent être impliqués (Sahay *et al.*, 2010a).

Ainsi, au cours de l'internalisation, les caractéristiques physico-chimiques des formulations, telles que leur nature, leur taille, leur forme et la présence de la charge de surface ou d'un ligand (type et densité) affecte les processus d'endocytose. Des facteurs extrinsèques comme l'état physiologique de la cellule sont aussi à considérer car ils joueraient sur l'expression des molécules de surface. Bien que les systèmes d'administration de médicaments améliorent leur activité biologique, il demeure que l'internalisation cellulaire n'est pas fonction de l'état pathologique des cellules. Il serait intéressant dans les études ultérieures de comparer l'internalisation sur des cellules saines et des cellules prétraitées par un inducteur de dommages comme l'acroléine. Suite à une administration orale des formulations chargées de curcumin.

Il serait intéressant d'étudier l'internalisation sur des systèmes plus pertinents biologiquement comme l'utilisation de siRNA qui peuvent spécifiquement inhiber une protéine clé du processus d'endocytose. Les systèmes modernes d'administration de médicament devront être capables d'emprunter une voie d'internalisation sécuritaire pour leurs cargos médicamenteux.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les MNDs se caractérisent par un ensemble de pathologies progressives qui conduisent à la mort des neurones et à la destruction du système nerveux suite à des lésions diffuses ou limitées à certaines zones spécifiques du cerveau. Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer la neuropathogénèse de la MA parmi lesquelles la formation des plaques A β , l'hyperphosphorylation de la protéine tau, le stress oxydatif, le dysfonctionnement mitochondrial et l'inflammation. À cette complexité étiologique s'ajoute la présence de la BHE qui limite l'accès des traitements au parenchyme cérébral. Les récentes avancées sur la compréhension des mécanismes de transport des systèmes nanoparticulaires à travers la BHE conduisent à une problématique pressante, à savoir la conception de nanovecteurs personnalisés permettant une internalisation neuronale optimisée. De ce fait, l'utilisation de la nanotechnologie pour l'administration des composés pléiotropiques ou encore multi-cibles comme le curcumin se dessinent comme une des stratégies prometteuses et d'actualité. En fonction du stade de la maladie et des composés encapsulés, cette approche pourrait s'imposer aussi bien dans un cadre préventif que thérapeutique pour les patients encore au stade précoce de la MA.

Dans ce travail, nous avons dans un premier temps montré que la composition matricielle, notamment le ratio L:G modulerait le devenir biologique des formulations de type PLGA chargées de curcumin. Plus précisément, les NPs de type PLGA 50:50 augmentent l'internalisation et améliore l'activité neuroprotectrice du curcumin.

Nous avons synthétisé et caractérisé les NPs de type PLGA modifiées au GSH et chargées de curcumin. Cette formulation préserve l'activité neuroprotectrice des formulations contre le stress oxydatif. La présence du GSH augmente l'absorption des formulations et modifie les mécanismes d'internalisation des particules de la macropinocytose vers l'endocytose dépendante des clathrines et des cavéoles.

La particularité de cette étude est l'interdisciplinarité de la nano-neuropharmacologie notamment une complémentarité de certains aspects de la nanotechnologie, la chimie et de la pharmacologie afin de mettre au point une stratégie pour l'administration des formulations dans les cellules neuronales.

Dans le cas du GSH, certains articles montrent un effet sur la perméabilité à travers la BHE. Cet aspect devrait être étudié ultérieurement notamment l'effet de la modification au GSH sur la perméabilité à travers la BHE en utilisant des modèles de BHE (*in vitro* et *in vivo*) et en comparaison avec d'autres ligands comme les apolipoprotéines (travaux en cours dans notre équipe).

Le système de distribution ciblé des médicaments dans les cellules du cerveau n'est pas sans inconvénient puisqu'il améliore certes la concentration de médicaments dans les sites pathologiques mais augmente aussi l'exposition des cellules neuronales saines; ce qui pourrait être associé à des effets non désirés. Par conséquent, le concept de double ciblage pour l'administration de médicaments à travers la BHE et sélectivement dans les sites pathologiques devrait avoir une attention croissante dans les conceptions futures. Elle pourrait donc dépendre d'un deuxième marquage pour une libération dépendante du potentiel redox par rupture des ponts disulfures, du pH ou toute autre caractéristique du site pathologique. Toutefois, de nombreux efforts devraient être portés à la standardisation des méthodes de préparation et le développement des outils de caractérisation des NPs modifiées, notamment du nombre de ligands par nanoparticule.

5 ANNEXES

5.1 Autres contributions

5.1.1 Annexe 1 : Article 3

Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways.

Contribution de l'étudiant

Sur cet article, publié dans le journal *Molecular Nutrition & Food Research* (impact facteur 4.31), je suis deuxième auteur. Les docteurs Sihem Doggui et Abdenour Belkacemi étant coauteurs, ont défini et réalisé la majorité des expériences de cet article notamment les immunobuvardages de type Western des facteurs de transcription (Nrf2 et P50) et des protéines (keap1, pAkt, Sirt 1, pGSK3, GCS) ainsi que la quantification du niveau de GSH et des protéines carbonylées. Certains répliquas lors de l'étude de la viabilité cellulaire et des tests de mortalités ont été réalisés par Morgane Perrotte alors stagiaire au laboratoire. J'ai réalisé l'étude des effets protecteurs des NPs sur la mortalité cellulaire induite par l'acroléine ainsi que la rédaction de cette partie. Nous étions tous sous la supervision de notre directeur de recherche. Les trois premiers auteurs ont également contribué aux corrections suggérées par les reviseurs, sous les directives de notre directeur de recherche, le Pr. Charles Ramassamy, qui a aussi effectué la soumission de l'article et les réponses aux questions

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

RESEARCH ARTICLE

Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways

Sihem Doggui^{1*}, Abdenour Belkacemi^{1*}, Ghislain Djiokeng Paka¹, Morgane Perrotte¹, Rongbiao Pi² and Charles Ramassamy^{1,3}

¹ INRS-Institut Armand Frappier, Laval, Québec, Canada

² Department of Pharmacology & Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, China

³ Department of Medical Biology, Faculty of Medicine Laval University, Québec, Canada

Scope: The aim of the present study was to examine the neuroprotective effect of curcumin against the toxicity induced by acrolein and to identify its cellular mechanisms and targets.

Methods and results: Human neuroblastoma cells SK-N-SH were treated with acrolein. Curcumin, from 5 μ M, was able to protect SK-N-SH cells against acrolein toxicity. The addition of curcumin restored the expression of γ -glutamylcysteine synthetase, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species levels but had no effect on the decrease of glutathione (GSH) and on the elevation of protein carbonyls. Acrolein induced the activity of Nrf2, NF- κ B, and Sirt1. These activations were prevented by the presence of curcumin. Acrolein also induced a decrease of the pAkt, which was counteracted by curcumin. To increase its solubility, we have encapsulated curcumin in a biodegradable poly(lactide-co-glycolide) based nanoparticulate formulation (Nps-Cur). Our results showed that 0.5 μ M of Nps-Cur can protect neuronal cells challenged with acrolein while free curcumin was not able to display neuroprotection.

Conclusion: Our results provided evidence that curcumin was able to protect SK-N-SH cells against acrolein toxicity. This protection is mediated through the antioxidant, the redox, and the survival regulated pathways by curcumin. Moreover, our results demonstrated that Nps-Cur had higher capacity than curcumin to protect SK-N-SH cells against acrolein.

Received: February 20, 2013

Revised: April 30, 2013

Accepted: May 2, 2013

Keywords:

Akt / Alzheimer's disease / Glutathione / Nrf2 / Sirtuins

1 Introduction

It is now well established that reactive oxygen species (ROS) and oxidative/electrophilic damage are implicated in various neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) [1–4]. In mild cognitive impairment (MCI) patients, an intermediary stage between a cognitively intact person and

AD, there is also a decrease in antioxidant systems leading to increased oxidative damage during the progression from MCI to AD [5, 6]. Coherent with the decrease in antioxidant levels and activities, there are elevated protein carbonyls and by-products of lipid peroxidation such as aldehyde by-products including malondialdehyde, 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), and acrolein in the brain from MCI subjects compared to age-matched controls [7]. Acrolein was found to be associated with proteins that were detected in neurofibrillary tangles and dystrophic neuritis surrounding senile plaques in AD [8]. A significant increase of acrolein level was observed in specific regions of the brain such as hippocampus, amygdala, and cerebellum from early AD as compared to control subjects [9, 10]. In hippocampus from AD, the acrolein/guanosine adducts in nuclear DNA are two fold higher as compared to age-matched control while it was not significantly different for 4-HNE/guanosine adducts [11, 12]. Recently, we have

Correspondence: Professor Charles Ramassamy, INRS-Institut Armand Frappier, 531, boulevard des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada

E-mail: Charles.Ramassamy@iaf.inrs.ca

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; DCF-DA, 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate; γ -GCS, γ -glutamylcysteine synthetase; GSH, glutathione; HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; HRP, horseradish peroxidase; LDH, lactate dehydrogenase; MCB, monochlorobimane; MCI, mild cognitive impairment; MEM, minimal essential medium Eagle; PLGA, poly(lactide-co-glycolide acid); ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species

*These authors contributed equally to this work.

shown that a chronic administration of acrolein to rats induced AD-like pathology such as MCI, hippocampal atrophy, and an upregulation of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE-1) [13].

Among by-products of lipid peroxidation, the most abundant aldehydes are HNE and malondialdehyde while acrolein is the most reactive [14]. Acrolein is a highly electrophilic, α,β -unsaturated carbonyl derivative due to its conjugated system composed of the aldehyde group and the carbon–carbon double bond that strongly facilitates its reactivity with nucleophile groups. Being the strongest electrophile among the unsaturated aldehydes, acrolein also displays strong reactivity with nucleophile compounds such as free sulfhydryl groups of cysteine residues in proteins [14,15], disrupting the cellular redox potential. The formation of adducts by acrolein is also linked to numerous intracellular regulations including cell signaling, inhibition of enzymatic activities, and mitochondrial dysfunction [16–20]. For instance, acrolein could trigger tyrosine phosphorylation mediated signaling events leading to the activation of MAPK, NF- κ B, Nrf2, Sirt-1, p66Shc, ERK, and HO-1 [21]. Therefore, due to its high reactivity, acrolein is not only a marker of lipid peroxidation but also an inducer of oxidative stress and an effector of tissue damage [21,22]. With growing evidences of the implication of acrolein in human diseases such as AD, the development of strategies to reduce its toxic effect is of great importance.

Some polyphenols such as epicatechin, epigallocatechin, epicatechin-3-gallate, epigallocatechin-3-gallate, theaflavin, theaflavin-3,30-digallate, cyanomaclurin, phloretin, and phloridzin have been demonstrated to be efficient scavengers of acrolein [23–25].

However, the protective effect of curcumin, one of the promising polyphenol for the treatment of AD [26,27], on the toxicity induced by acrolein on neuronal cells remains to be investigated. Curcumin is a hydrophobic polyphenol derived from the rhizome (turmeric) of the herb *Curcuma longa* and has been identified as the active component of turmeric. Using different paradigms, curcumin has been shown to display antioxidant, anti-inflammatory, metal chelators, anti-amyloid, anti-tau, and neuroprotective activities [27]. Moreover, curcumin could also regulate different pathways targeted by acrolein [27]. Considering the neuronal mechanisms activated by acrolein, we hypothesized that curcumin could protect neuronal cells against acrolein-induced toxicity. Our results show that curcumin-induced neuroprotection is mediated through the reduction of intracellular ROS generation, and the modulation of the activity of some redox-regulated proteins and survival networks, that is NF- κ B, Nrf2, Sirt1, and Akt that are implicated in the pathogenesis of AD.

On the other hand, enhancement of curcumin solubility and stability following its oral bioavailability represents a pharmacological challenge for its therapeutic applications. Recent clinical trials suggested limited bioavailability of curcumin in humans [26]. We have recently developed and characterized curcumin-loaded poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles (Nps-Cur) [28]. Therefore, the protective ef-

fect of Nps-Cur was addressed in this study and our results demonstrated that the efficacy of curcumin against acrolein is higher when it is loaded in PLGA-nanoparticles.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Curcumin, acrolein, dimethylammonium bromide, cell survival assay Tox-8 (resazurin-based), monochlorobimane (MCB), glutathione-S-transferase, minimal essential medium Eagle (MEM), fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, and sodium pyruvate were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Ethyl acetate was purchased from Fisher (Ottawa, ON, Canada), and cytotoxicity detection kit-lactate dehydrogenase (LDH) was purchased from Roche Diagnostics (Laval, Quebec, Canada). 2',7'-Dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA) was from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Nuclear protein extraction kit and bicinchoninic acid (BCA) protein estimation kit were obtained from Active Motif (CA, USA) and from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA), respectively.

Rabbit polyclonal anti-phospho-Akt (p-AKT-Ser473), monoclonal anti-rabbit GSK-3 β , and rabbit monoclonal anti-phospho-GSK-3 β (pGSK-3 β -Ser9) were purchased from Cell Signaling Technology. Polyclonal anti- γ -glutamyl-cysteine-synthase and rabbit polyclonal anti-Nrf2 antibodies were from Abcam (Cambridge, MA, USA). Rabbit polyclonal anti-NF- κ B p50 antibody was from Delta Biolabs (Gilroy, CA, USA). Rabbit polyclonal anti-human Sirt-1 antibody was from eBioscience (San Diego, CA, USA). Mouse monoclonal anti-GAPDH antibody was from Chemicon (Millipore, Mississauga, ON, Canada). Rabbit and Mice horseradish peroxidase (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 multidetection microplate reader.

2.2 Cell culture

SK-N-SH cells, a human neuroblastoma cell line from ATCC (Manassas, VA, USA), were maintained in MEM, supplemented with 10% v/v fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and sodium pyruvate (1 mM) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. Cells were grown to 80% confluence and then seeded in multiwell cell culture plates for the experimental procedures.

2.3 Cytotoxicity assays

SK-N-SH cells were plated at a density of 2.0×10^4 cells/well in 96-well plates and incubated for 24 h at 37°C. Then, the media were completely removed and cells were kept in MEM. Cells were cotreated with different concentrations of

curcumin and/or acrolein. Cell death and survival were assessed 24 h after the treatment using, respectively, the cytotoxicity detection kit-LDH and Tox-8 (resazurin-based) following the manufacturer's instructions. Values obtained from controls, untreated cells, were considered as 100%.

2.4 Intracellular ROS/reactive nitrogen species (RNS)

Intracellular ROS and RNS accumulation was measured by following the oxidation of DCF-DA, a nonfluorescent, cell permeable dye that upon hydrolysis by intracellular esterases reacts with ROS/RNS to produce a highly fluorescent compound, DCF, which is trapped inside the cells. Briefly, SK-N-SH cells (2×10^4 /well) were plated into 96-well plates and allowed to attach. The medium was removed and cells were first kept in PBS containing $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ and $10 \mu\text{M}$ DCF-DA for 20 min, then cells were washed and treated with curcumin and/or $10 \mu\text{M}$ of acrolein for 1 h. At the end of the treatment, 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.

2.5 Protein extraction

After 30 min of treatment, total protein from SK-N-SH cells was 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.

2.6 Western blot analysis

Equal amount of protein cell lysates ($30 \mu\text{g}$) was separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred onto polyvinyl difluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked for 1 h in TBS with 5% skim milk and incubated with primary antibodies: anti-Keap 1 (1/700), p-AKT (1/1000), anti- γ -GCS (1/500), anti-p-GSK3 (1/1000), anti-Nrf2 (1/1000), anti-NF- κ B p50 (1/200), anti-Sirt-1 (1/500), and anti-GAPDH (1/1000). Then, membrane was incubated with the secondary antibody HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse (1/10 000) 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.

2.7 Protein carbonyls measurement

Briefly, $20 \mu\text{g}$ of whole cell extract was derivatized with 5 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine in 2 N HCL for 15 min at room

temperature. Derivatized protein samples were then loaded on a 10% polyacrylamide gel for electrophoresis, and transferred onto a PVDF membrane using a Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad). The membranes were exposed to the rabbit anti-DNP antibody (1/2000) followed by the secondary antibody anti-rabbit IgG HRP (1/10 000) both for 1 h in TBS containing 5% BSA. Detection was realized with Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, USA) and the bands were visualized and quantified by densitometric analysis using FluorChem. To control the equal protein loading in each well, membranes were stained with Coomassie blue dye. Data were expressed as a percentage of the control group.

2.8 Determination of glutathione (GSH) level

Cellular level of GSH was measured using a cell permeable fluorescent dye MCB that forms adducts with GSH. For this, after 24 h of plating, cells were starved and treated with acrolein ($20 \mu\text{M}$) or with a combination of acrolein ($20 \mu\text{M}$) and curcumin (5, 10, or $20 \mu\text{M}$). After 30 min of treatment, cells were washed with PBS containing 1 mM of MgCl_2 and 1 mM of CaCl_2 and incubated in $100 \mu\text{M}$ MCB, at 37°C for 30 min. The fluorescence of the bimine–glutathione conjugates was determined using a Synergy HT multidetection microplate reader at 360/480 nm. The values of control cells were considered as 100%.

2.9 Preparation of void nanoparticles (Nps) and nanoparticles-loaded curcumin (Nps-Cur)

Among the various techniques available for the formulation of nanoparticles, the choice of the method depends mainly on the solubility of the therapeutic moiety. Due to the hydrophobic properties of curcumin, Nps-Cur were prepared by emulsion–diffusion–evaporation method, as previously reported [28]. Briefly, the emulsion–diffusion–evaporation method was used due to the hydrophobic properties of curcumin. Curcumin and polymer were dissolved in ethyl acetate while stirring for 1 h. Then, this organic phase was added to aqueous phase containing dimethylammonium bromide stabilizer (1%, w/v) to form an emulsion. After homogenization, the resulting formulation was then rotary evaporated to remove the organic phase under reduced pressure. For the preparation of void Nps, the same procedure was followed without curcumin. To analyze the protective effects of Nps-Cur, SK-N-SH cells were plated at a density of 2.0×10^4 cells/well in 96-well plates and incubated for 24 h at 37°C . Cells were then starved and treated with Nps, and $0.5 \mu\text{M}$ of either Nps-Cur or curcumin. Cells were immediately treated with $10 \mu\text{M}$ of acrolein. Cell death and survival were assessed 24 h after the treatment as described in Section 2.3.

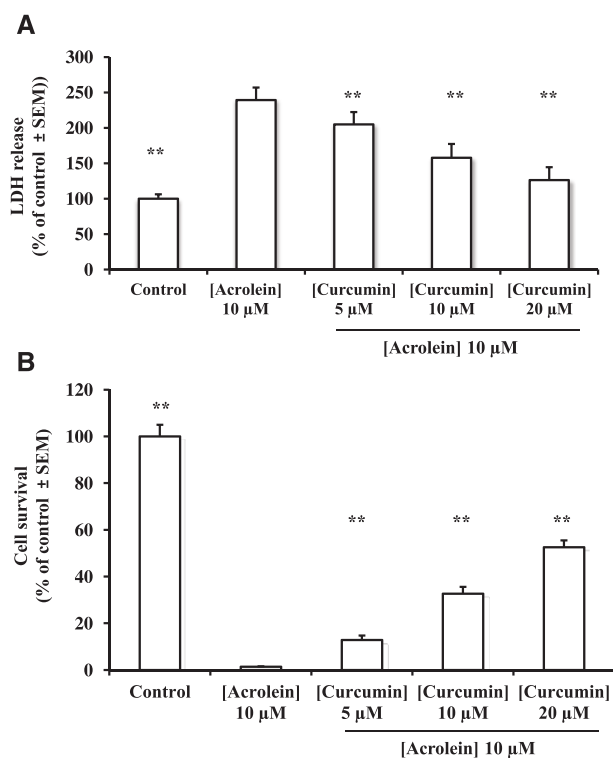


Figure 1. Effects of curcumin on SK-N-SH cell death/survival induced by acrolein. Cells were cotreated for 24 h with curcumin at different concentrations and 10 μM of acrolein. (A) Cell death was evaluated by LDH release assay and (B) cell survival was analyzed by resazurin assay. Results are expressed as percentage of control (considered as 100%). Data are mean ± SEM from at least three separate experiments performed in sextuplicate in each group with $**p < 0.01$ indicating a statistically significant difference versus acrolein-treated group.

2.10 Statistical analysis

Data are reported as means ± SEM from at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Dunnett multiple comparisons test. Differences were considered significant when p -values were less than 0.05. Analyses were performed using INSTAT software.

3 Results

3.1 Curcumin protects SK-N-SH cells against acrolein-induced toxicity

We have previously characterized the dose and time effect of acrolein-induced toxicity on SK-N-SH cells [21]. Results in Fig. 1 show that curcumin protected SK-N-SH cells against acrolein toxicity. This protection was assessed by the LDH and resazurin assays 24 h after the treatments and was significant for 5 μM of curcumin.

3.2 Effect of curcumin on the elevation of oxidative markers induced by acrolein

It is well known that the antioxidant GSH plays a key role in the detoxification of acrolein. We have demonstrated that acrolein induced a biphasic effect on GSH levels with a rapid depletion after 30 min of treatment [21]. Coherent with previous data, results in Fig. 2 confirmed that treatment with acrolein led to a rapid decrease of GSH, and an increase of ROS and RNS levels as well as protein carbonyls after 30 min of treatment. With 20 μM of acrolein, the upregulation of the expression of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) was observed as soon as 30 min while with lower dose (10 μM), this upregulation was observed only after 24 h of treatment [21].

The addition of curcumin restored the expression of γ -GCS, ROS, and RNS levels but had no effect on the decrease of GSH and on the elevation of protein carbonyls (Fig. 2).

3.3 Effect of curcumin on the modification of the redox-regulated transcription factor activities induced by acrolein

Previous studies have reported that acrolein-induced oxidative damage implicated Nrf2, NF- κ B, Sirt1, and Akt/GSK3 signaling pathways to mediate cell death or survival. To examine whether these signaling pathways were involved in the protective mechanisms of curcumin, their activities were assayed by Western blotting. We have demonstrated that the activity of the transcription factors NF- κ B and Nrf2 was, respectively, increased after 30 min and 24 h of treatment with 10 μM of acrolein [21]. However, with higher concentration of acrolein (20 μM), the activity of Nrf2 increased in parallel with NF- κ B as early as 30 min of treatment (Fig. 3). Interestingly, both activations were prevented by the presence of curcumin.

The induction of Sirt1 has been observed in various neurotoxic conditions and it may be considered as an important stress sensor molecule. With 10 μM concentration of acrolein, Sirt1 has been shown to be activated after 24 h of treatment in SK-N-SH cells [21]. With higher concentration of acrolein (20 μM), Sirt1 was activated as early as 30 min of treatment but this activity was counteracted by 10 μM of curcumin (Fig. 4A).

The Akt signaling plays an important role in neuronal survival. To examine if Akt pathway is implicated in the neuroprotective effect of curcumin, we have examined the phosphorylation of Akt at serine 473 by Western blotting. Our results showed that the phosphorylation of Akt was decreased after 30 min of exposure to acrolein (Fig. 4B). The decrease of the phosphorylation of Akt coincides with the decrease of cell survival. Interestingly, the addition of curcumin to acrolein-treated cells was associated with a significant increase in phosphorylated Akt. These results indicate that the protective effect of curcumin against acrolein is mediated through the activation of the Akt pathway.

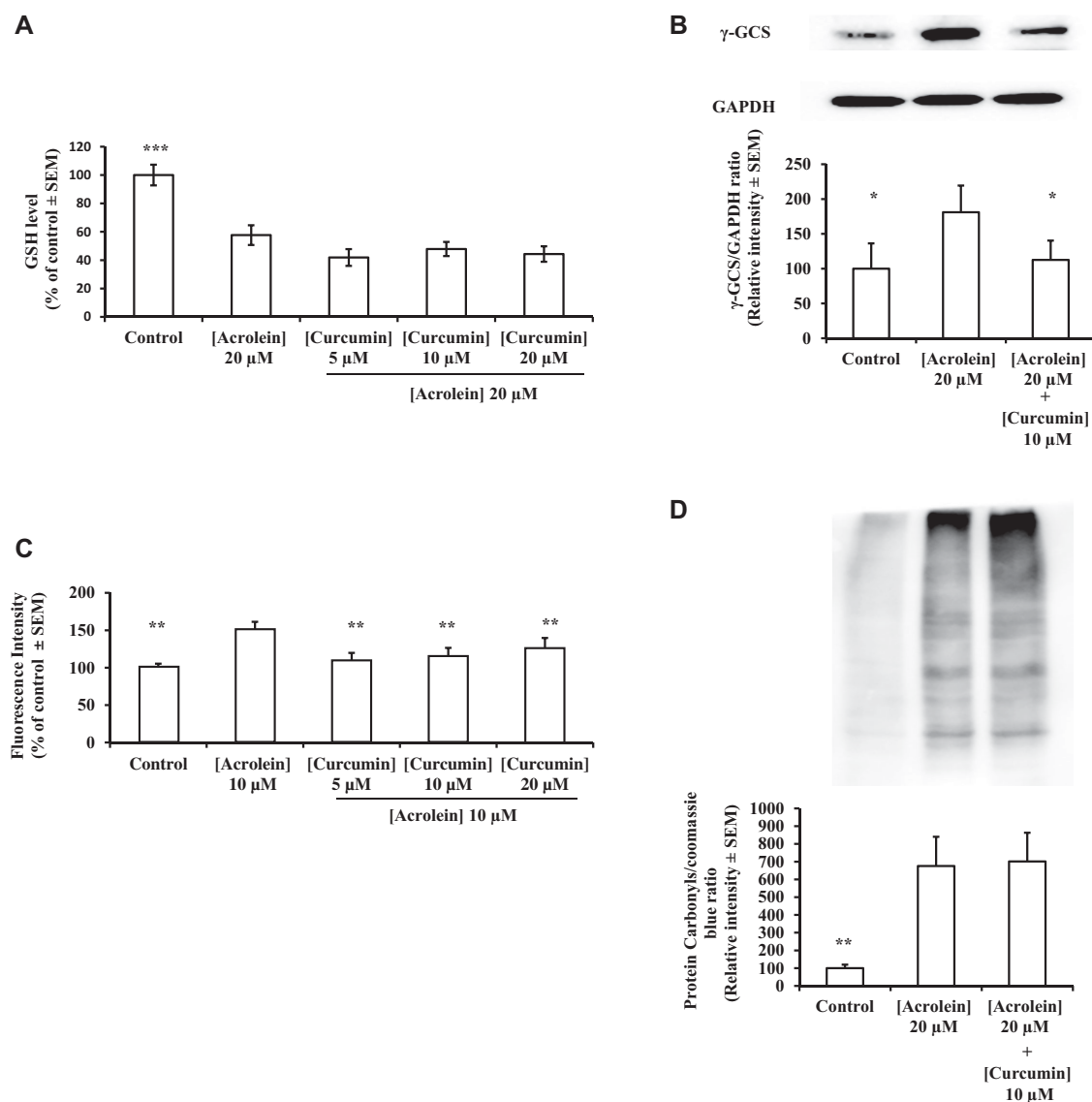


Figure 2. Effects of curcumin and acrolein on the levels of GSH, γ -GCS, ROS, and protein carbonyl levels. After 30 min of treatment, (A) GSH levels were measured using a cell permeable fluorescent dye MCB; (B) γ -GCS protein levels were analyzed by Western blotting with GAPDH being used as a marker for equal protein loading. Blots represent one of three independent experiments and bar graph represents quantitative results of the ratio between γ -GCS and GAPDH. (C) ROS and RNS levels were determined by the fluorescence probe DCF-DA. (D) Protein carbonyls were assessed on total protein extracts from SK-N-SH cells with staining by Coomassie blue dye being used for protein loading control. Blots represent one of three independent experiments and bar graph represents quantitative results of the ratio between total carbonyl and Coomassie blue staining. Results are expressed as percentage of control (considered as 100%). Data are mean \pm SEM from at least three separate experiments performed in sextuplicate in each group for (A and C) and from at least three independent experiments for (B and D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ indicating statistical differences versus acrolein-treated group.

GSK-3 β is one of the phosphorylated downstream substrates of Akt, which in its activated form (dephosphorylated) promotes cell death in response to oxidative insults [29]. We have thus examined the phosphorylation of GSK-3 β after exposure to acrolein. Our results indicated that acrolein did not cause the dephosphorylation of GSK-3 β at serine 9 (Fig. 4C).

3.4 Nps-Cur protects SK-N-SH cells against acrolein induced-cytotoxicity

We have previously characterized Nps-Cur and demonstrated that the uptake of curcumin by SK-N-SH cells was higher with Nps-Cur than curcumin [28]. We have thus compared the efficacy of curcumin and Nps-Cur on the toxicity induced

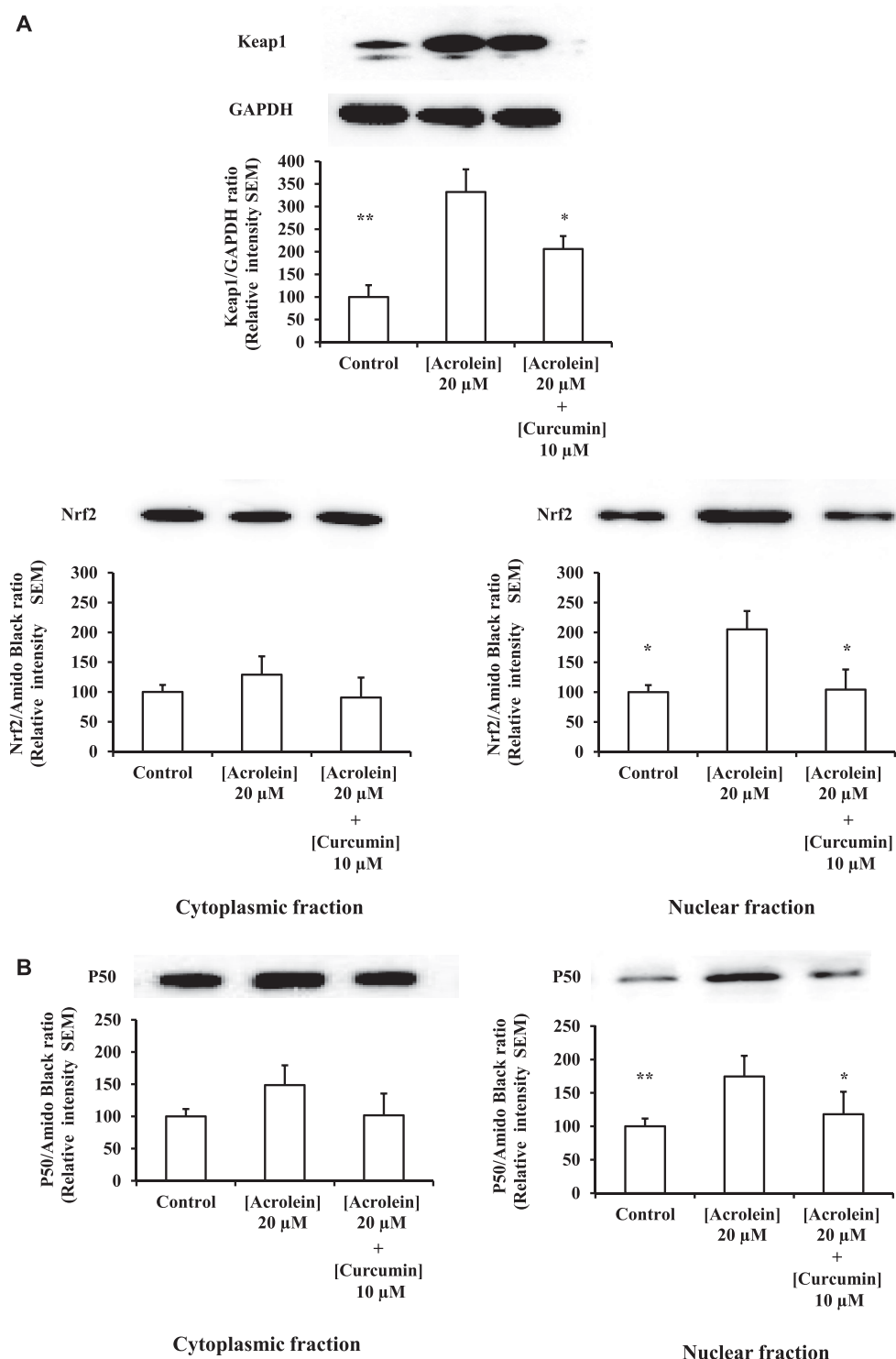


Figure 3. Effects of acrolein and curcumin on the Nrf2 and NF- κ B activities. After 30 min of treatment, (A) levels of Keap1 were analyzed on total proteins. Blots represent one of three independent experiments and bar graph represents quantitative results of the ratio between Keap1 and GAPDH used as protein loading control. (B) Nrf2 levels were determined on the cytoplasmic and nuclear fractions. (C) Levels of p50, one of the subunits of NF- κ B, were determined in the cytoplasmic and nuclear fractions. Blots represent one of three independent experiments and bar graph represents quantitative results of the ratio between Nrf2 or p50 and amido black used as protein loading control. Results are expressed as percentage of control (considered as 100%) with * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicating statistical differences versus acrolein-treated group.

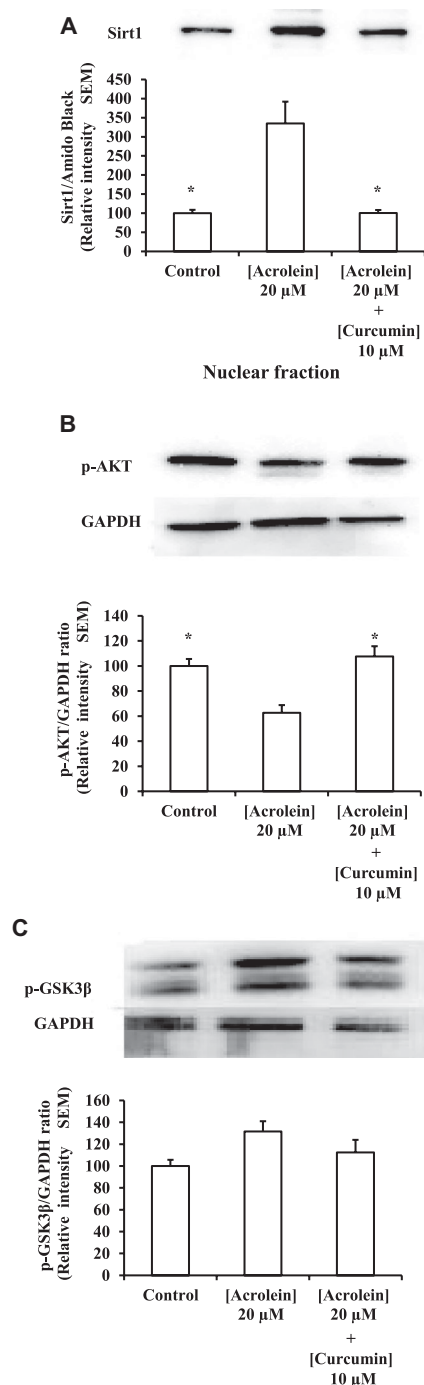


Figure 4. Effects of acrolein and curcumin and the levels of Sirt1 and Akt/GSK-3 β pathways. After 30 min of treatment, (A) levels of Sirt1 were measured on the nuclear fractions. Blots represent one of three independent experiments and bar graph represents quantitative results of the ratio between Sirt1 and amido black used as protein loading control. Levels of (B) p-Akt and (C) p-GSK-3 β were measured on total protein fractions. Blots represent one of three independent experiments and bar graph represents quantitative results of the ratio between p-Akt or p-GSK-3 β and GAPDH used as protein loading control. Results are expressed as percentage of control (considered as 100%) with * $p < 0.05$ indicating a statistical difference versus acrolein-treated group.

by acrolein. Our results showed that 0.5 μ M of Nps-Cur formulations can protect neuronal cells challenged with 10 μ M of acrolein for 24 h. At the same concentration, curcumin was not able to exhibit a significant neuroprotective effect. Curcumin of 0.5 μ M concentration was selected in this experiment because it corresponds to the concentration of curcumin encapsulated in nanoparticles and the highest nontoxic concentration [28]. PLGA Nps had no effect (Fig. 5).

4 Discussion

Our results demonstrated that curcumin can efficiently protect the human SK-N-SH neuronal cells against acrolein-induced toxicity, the most reactive by-product of lipoperoxidation. The protective effect was mediated through the ROS and RNS scavenging ability of curcumin, and the modulation of the activity of redox sensitive and survival pathways such as Nrf2, NF- κ B, Sirt1, and Akt. These findings are of great interest because acrolein has shown to be generated in specific regions of the brain from AD. More interestingly, acrolein was also evidenced in MCI patients. In animal models, acrolein induces AD-like pathology [13]. On the other hand, curcumin represents a promising compound for the treatment of AD.

Several studies have evidenced a significant increase of acrolein in hippocampus and amygdala from AD subjects [9, 10, 30]. Furthermore, the production of acrolein was observed earlier than 4-HNE and was approximately five times higher than 4-HNE [9, 10]. Very recently, Bradley and colleagues [31] demonstrated that levels of extractable acrolein were 2.5-fold higher in hippocampus (4.9 nmol/mg protein) from preclinical AD, a likely prodromal phase of AD compared to normal controls (1.9 nmol/mg protein).

Numerous studies have highlighted the ability of polyphenolic compounds to promote a variety of pharmacological and biological activities related to AD pathophysiology [32]. Among 214 antioxidant compounds tested, curcumin had the strongest inhibitor effect on A β fibrils formation [33]. Moreover, in mouse primary cortical neurons, curcumin decreased A β levels and the amyloid precursor protein (APP) maturation [34]. A β binding of curcumin was also nicely demonstrated in vivo using a multiphoton imaging system with 30% reduction of A β plaque size after 1 week of injection [35]. Recently, curcumin has been shown to reduce soluble tau and elevated heat shock proteins involved in tau clearance [36]. Taken together, these results prompted us to investigate the protective effect of curcumin on acrolein-induced toxicity.

Due to its polyphenolic chemical structure, this yellow pigment possesses strong free radical scavenging activity. In fact, curcumin can directly neutralize active oxygen species including superoxide and hydroxyl radicals [37, 38] and therefore can decrease the fluorescence emitted by DCF assay. Furthermore, curcumin could also increase the activities of catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase [39]. However, we cannot exclude the possibility that curcumin could

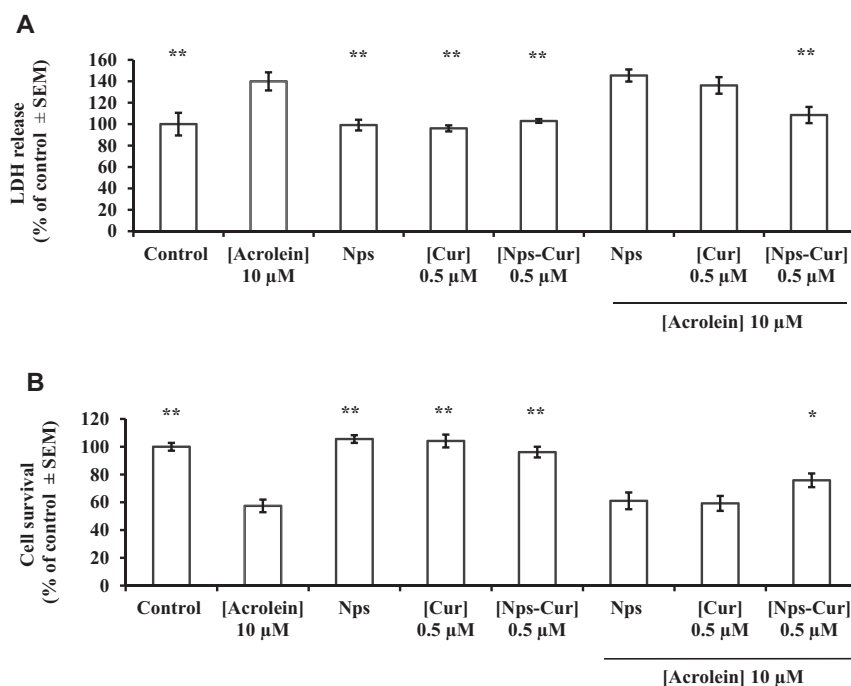


Figure 5. Effects of Nps and Nps-Cur on cell death and viability with or without acrolein. Cell death was analyzed by LDH assay (A) and cell survival by resazurin-based assay (B), 24 h after different treatments. Volume of NPs-Cur added corresponds to 0.5 μM of curcumin. Results are expressed as percentage of control (considered as 100%). Data are means ± SEM from at least three separate experiments performed in sextuplicate for each group with * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicating statistical differences versus acrolein-treated group.

also scavenge NO as acrolein can also stimulate NO production [40]. Our results suggest that the antioxidant activity of curcumin for NO-related radical is involved in its neuroprotective effect because the increase of protein carbonyls and the decrease of GSH were not restored by curcumin.

We have previously demonstrated on the human neuroblastoma cell line SK-N-SH and on primary astrocytes that acrolein, as a strong electrophile molecule, can deplete cellular GSH levels by forming the acrolein–GSH adduct or GS-propionaldehyde [41]. Although our results demonstrated that the expression of γ -GCS was induced by acrolein, the synthesis of GSH was not sufficient to compensate its decrease likely due to the rapid formation of acrolein–GSH adduct. In addition to the depletion of GSH, acrolein can also very effectively, in a short term, covalently bind to proteins and introduce carbonyl group, a marker of protein oxidation [42], and thus impairs the function of specific proteins such as proteasomes. The elevation of protein carbonyls was not reversed by curcumin likely due to the inhibition of the activity of 20S proteasomes by acrolein [43].

The formation of adducts by acrolein has been linked to numerous intracellular regulation including cell signaling by acting at multiple sites. Acrolein could trigger tyrosine phosphorylation mediated signaling events leading to the activation of NF- κ B, Sirt1, and Nrf2 pathways, which are important factors in protecting cells from oxidative damage. We demonstrated that the kinetic of the activation of some of these events is dependent on the concentration of acrolein. For instance, with 10 μM of acrolein, the Nrf2 pathway and the expression of Sirt1 were increased following 24 h of treatment [21]. In this study, with higher concentration of acrolein, Nrf2 and Sirt1 were activated as early as 30 min of treatment. These

activations could be considered as compensatory mechanisms because Nrf2 and Sirt1 represent the most important cellular defense mechanisms to combat oxidative stress. However, our results indicated that these compensatory mechanisms are not sufficient to preserve cell survival in the presence of acrolein and suggest that antioxidant defense mechanisms targeted by Nrf2 and Sirt1 are only partly involved in the protective effect against acrolein. On the other hand, an overexpression of Sirt1 could also be detrimental for neurons [44]. Interestingly, the presence of curcumin completely restores the activity of these transcription factors and suggests that the effect of curcumin is not simply based on its antioxidant ability. These results strengthen the notion that the protective effect of curcumin against acrolein is not mediated through the enhancement of antioxidant pathways or the phase II detoxifying enzymes.

We have then analyzed the effect of acrolein and curcumin on the activity of NF- κ B, another pathway involved in neuroprotection. Coherent with our previous data, we found that exposure to acrolein induced a rapid nuclear translocation of the subunit p50 after 30 min of treatment. Many mechanisms can account for NF- κ B activation such as the elevation of ROS or the depletion of GSH. This activation is also consistent with the inhibition of Akt as NF- κ B is known to be negatively regulated by Akt [45]. We found that the activation of NF- κ B, a predominant target of curcumin, is downregulated [46]. This result is consistent with the anti-inflammatory activity of curcumin through the inhibition of the phosphorylation and degradation of the subunit I κ B α , of I κ B-kinase activity likely at the complex IKK α / β , and of the activity of the proteasomes 26S [47–50].

Previous studies have reported that acrolein activates Akt/GSK-3 signaling pathways, a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase, to mediate cell death or survival, differentiation, and apoptosis responses [19,51,52]. Akt has been shown to be inactivated by oxidative stress [53]. We have then examined whether these pathways are involved in the protective effect of curcumin. Our results showed that acrolein decreased Akt activity and cell survival. The addition of curcumin restored the activity of Akt and promoted cell survival. Then, we have analyzed the effect of acrolein and curcumin on GSK-3 β , the major downstream target of Akt. Our results also demonstrated that the phosphorylation of GSK-3 β induced by acrolein is time-dependent. In our previous study, we have shown that acrolein induced the phosphorylation of GSK-3 β after 24 h of treatment [52] while in this study, the phosphorylation of GSK-3 β was not observed after 30 min of treatment. GSK-3 β is thought to induce apoptosis by activating caspase-3 [54]. The lack of the phosphorylation of GSK-3 β following 30 min of treatment is consistent with our previous results indicating that acrolein did not elevate the activity of caspase-3 [21].

Although curcumin is a promising compound for the AD treatment, several factors including its insolubility in water lead to its poor systemic bioavailability and make it a challenging molecule for oral delivery [27]. Using nanotechnology, some studies have demonstrated higher efficacy and bioavailability of curcumin on different paradigms. Indeed, PLGA polymers are characterized by their biocompatibility and biodegradability [55] and are approved by the US Food and Drug Administration. The size of our nanoparticles (80–120 nm) [28] is in the range to avoid opsonization [56], resulting in prolonged duration of action as well as enhancing the drug to specific sites. Our data demonstrate that 0.5 μ M of curcumin entrapped in Nps-Cur protects cells against acrolein toxicity while the same concentration of curcumin was inefficient. This efficacy is likely due to higher uptake of Nps-Cur by SK-N-SH cells as demonstrated in our previous study [28].

In conclusion, our results provided evidence that curcumin was able to protect SK-N-SH cells against acrolein toxicity. This protection is mediated through the antioxidant, the redox, and the survival regulated pathways by curcumin. Moreover, our results demonstrated that Nps-Cur have higher capacity to protect SK-N-SH cells against acrolein. Finally, this study strengthens the notion that curcumin could have a great potential for pharmacological application in neurodegenerative disorders such as AD.

Financial support was obtained from NSERC (CR). S.D. gratefully acknowledges financial support from the Foundation Armand-Frappier and GPD from AUF.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Christen, Y., Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 71, 621S–629S.
- [2] Sonnen, J. A., Breitner, J. C., Lovell, M. A., Markesbery, W. R. et al., Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, 45, 219–230.
- [3] Lopez, N., Tormo, C., De Blas, I., Llinares, I. et al., Oxidative stress in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with high sensitivity and specificity. *J. Alzheimers Dis.* 2012, 33, 823–829.
- [4] Belkacemi, A., Ramassamy, C., 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.* 2012, 52, 593–600.
- [5] Portet, F., Ousset, P. J., Visser, P. J., Frisoni, G. B. et al., Mild cognitive impairment (MCI) in medical practice: a critical review of the concept and new diagnostic procedure. Report of the MCI Working Group of the European Consortium on Alzheimer's Disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2006, 77, 714–718.
- [6] Guidi, I., Galimberti, D., Lonati, S., Novembrino, C. et al., Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2006, 27, 262–269.
- [7] Reed, T., Perluigi, M., Sultana, R., Pierce, W. M. et al., Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 2008, 30, 107–120.
- [8] Calingasan, N. Y., Uchida, K., Gibson, G. E., Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1999, 72, 751–756.
- [9] Lovell, M. A., Xie, C., Markesbery, W. R., Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. *Neurobiol. Aging* 2001, 22, 187–194.
- [10] Williams, T. I., Lynn, B. C., Markesbery, W. R., Lovell, M. A., 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, 1094–1099.
- [11] Liu, X., Lovell, M. A., Lynn, B. C., Development of a method for quantification of acrolein-deoxyguanosine adducts in DNA using isotope dilution-capillary LC/MS/MS and its application to human brain tissue. *Anal. Chem.* 2005, 77, 5982–5989.
- [12] Liu, X., Lovell, M. A., Lynn, B. C., Detection and quantification of endogenous cyclic DNA adducts derived from trans-4-hydroxy-2-nonenal in human brain tissue by isotope dilution capillary liquid chromatography nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 2006, 19, 710–718.
- [13] Huang, Y. J., Jin, M. H., Pi, R. B., Zhang, J. J. et al., Acrolein induces Alzheimer's disease-like pathologies in vitro and in vivo. *Toxicol. Lett.* 2013, 217, 184–191.
- [14] Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 1991, 11, 81–128.

- [15] Hinson, J. A., Roberts, D. W., Role of covalent and noncovalent interactions in cell toxicity: effects on proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1992, 32, 471–510.
- [16] Picklo, M. J., Montine, T. J., Acrolein inhibits respiration in isolated brain mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1535, 145–152.
- [17] Roy, J., Palapati, P., Bettaieb, A., Tanel, A. et al., Acrolein induces a cellular stress response and triggers mitochondrial apoptosis in A549 cells. *Chem. Biol. Interact.* 2009, 181, 154–167.
- [18] Tanel, A., Averill-Bates, D. A., The aldehyde acrolein induces apoptosis via activation of the mitochondrial pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 1743, 255–267.
- [19] Tanel, A., Averill-Bates, D. A., P38 and ERK mitogen-activated protein kinases mediate acrolein-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Cell Signal.* 2007, 19, 968–977.
- [20] Tanel, A., Averill-Bates, D. A., Activation of the death receptor pathway of apoptosis by the aldehyde acrolein. *Free Radic. Biol. Med.* 2007, 42, 798–810.
- [21] Thanh Nam, D., Arseneault, M., Zarkovic, N., Waeg, G. et al., Molecular regulations induced by acrolein in neuroblastoma SK-N-SH cells: relevance to Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2010, 21, 1197–1216.
- [22] Calingasan, N. Y., Chen, J., Kiaei, M., Beal, M. F., Beta-amyloid 42 accumulation in the lumbar spinal cord motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol. Dis.* 2005, 19, 340–347.
- [23] Zhu, Q., Liang, C. P., Cheng, K. W., Peng, X. et al., Trapping effects of green and black tea extracts on peroxidation-derived carbonyl substances of seal blubber oil. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 1065–1069.
- [24] Zhu, Q., Zheng, Z. P., Cheng, K. W., Wu, J. J. et al., Natural polyphenols as direct trapping agents of lipid peroxidation-derived acrolein and 4-hydroxy-trans-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* 2009, 22, 1721–1727.
- [25] Beretta, G., Furlanetto, S., Regazzoni, L., Zarrella, M. et al., Quenching of alpha,beta-unsaturated aldehydes by green tea polyphenols: HPLC-ESI-MS/MS studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48, 606–611.
- [26] Ringman, J. M., Frautschy, S. A., Teng, E., Begum, A. N. 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, 43–50.
- [27] Belkacemi, A., Doggui, S., Dao, L., Ramassamy, C., Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. *Expert Rev. Mol. Med.* 2011, 13, e34.
- [28] Doggui, S., Sahni, J. K., Arseneault, M., Dao, L. et al., Neuronal uptake and neuroprotective effect of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the human SK-N-SH cell line. *J. Alzheimers Dis.* 2012, 30, 377–392.
- [29] Castelo-Branco, G., Rawal, N., Arenas, E., GSK-3beta inhibition/beta-catenin stabilization in ventral midbrain precursors increases differentiation into dopamine neurons. *J. Cell Sci.* 2004, 117, 5731–5737.
- [30] Singh, M., Nam, D. T., Arseneault, M., Ramassamy, C., Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. *J. Alzheimers Dis.* 2010, 2193, 741–756.
- [31] Bradley, M. A., Markesbery, W. R., Lovell, M. A., Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein in the brain in pre-clinical Alzheimer's disease (PCAD). *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 48, 1570–1576.
- [32] Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V. 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, 4855–4873.
- [33] Kim, H., Park, B. S., Lee, K. G., Choi, C. Y. et al., Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 8537–8541.
- [34] Zhang, C., Browne, A., Child, D., Tanzi, R. E., Curcumin decreases amyloid-beta peptide levels by attenuating the maturation of amyloid-beta precursor protein. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 28472–28480.
- [35] Garcia-Alloza, M., Borrelli, L. A., Rozkalne, A., Hyman, B. T. 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, 1095–1104.
- [36] Ma, Q. L., Zuo, X., Yang, F., Ubeda, O. J. et al., Curcumin suppresses soluble tau dimers and corrects molecular chaperone, synaptic, and behavioral deficits in aged human tau transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 4056–4065.
- [37] Sreejayan, N., Rao, M. N., Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 1997, 49, 105–107.
- [38] Saldanha, L. A., Elias, G., Rao, M. N., Oxygen radical scavenging activity of phenylbutenones and their correlation with antiinflammatory activity. *Arzneimittelforschung* 1990, 40, 89–91.
- [39] El-Demerdash, F. M., Yousef, M. I., Radwan, F. M., Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food Chem. Toxicol.* 2009, 47, 249–254.
- [40] Misonou, Y., Asahi, M., Yokoe, S., Miyoshi, E. et al., Acrolein produces nitric oxide through the elevation of intracellular calcium levels to induce apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: implications for smoke angiopathy. *Nitric Oxide* 2006, 14, 180–187.
- [41] Adams, J. D., Jr., Klaidman, L. K., Acrolein-induced oxygen radical formation. *Free Radic. Biol. Med.* 1993, 15, 187–193.
- [42] Uchida, K., Kanematsu, M., Sakai, K., Matsuda, T. et al., Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 4882–4887.
- [43] Shamoto-Nagai, M., Maruyama, W., Hashizume, Y., Yoshida, M. et al., In parkinsonian substantia nigra, alpha-synuclein is modified by acrolein, a lipid-peroxidation product, and accumulates in the dopamine neurons with inhibition of proteasome activity. *J. Neural. Transm.* 2007, 114, 1559–1567.
- [44] Kakefuda, K., Fujita, Y., Oyagi, A., Hyakkoku, K. et al., Sirtuin 1 overexpression mice show a reference memory deficit,

- but not neuroprotection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009, *387*, 784–788.
- [45] Zhao, L., Lee, J. Y., Hwang, D. H., The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway negatively regulates Nod2-mediated NF-kappaB pathway. *Biochem. Pharmacol.* 2008, *75*, 1515–1525.
- [46] Singh, S., Aggarwal, B. B., Activation of transcription factor NF-kappaB is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J. Biol. Chem.* 1995, *270*, 24995–25000.
- [47] Hayden, M. S., Ghosh, S., Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004, *18*, 2195–2224.
- [48] Buhrmann, C., Mobasheri, A., Busch, F., Aldinger, 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*, 28556–28566.
- [49] Leu, T. H., Maa, M. C., The molecular mechanisms for the antitumorigenic effect of curcumin. *Curr. Med. Chem. Anti-cancer Agents.* 2002, *2*, 357–370.
- [50] Milacic, V., Banerjee, S., Landis-Piwowar, K. R., Sarkar, F. H. et al., Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2008, *68*, 7283–7292.
- [51] Manning, B. D., Cantley, L. C., AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007, *129*, 1261–1274.
- [52] Huang, Y., Jin, M., Pi, R., Zhang, J. et al., Protective effects of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester against acrolein-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Neurosci. Lett.* 2013, *535*, 146–151.
- [53] Lee, J. E., Kang, J. S., Ki, Y. W., Lee, S. H. et al., Akt/GSK3beta signaling is involved in fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol. Lett.* 2011, *202*, 133–141.
- [54] Chen, G., Bower, K. A., Ma, C., Fang, S. et al., Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB J.* 2004, *18*, 1162–1164.
- [55] Mittal, G., Carswell, H., Brett, R., Currie, S. 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*, 220–228.
- [56] Allemann, E., Leroux, J. C., Gurny, R., Doelker, E., In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm. Res.* 1993, *10*, 1732–1737.

5.1.2 Annexe 2 : Article 4

Effect of polymer architecture on Curcumin 1 encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: toward a drug delivery nano-platform to the CNS

Contribution de l'étudiant

Cet article a été publié dans ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*** (impact facteur 3.383). Sur cette publication réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr Banquy Xavier, je suis deuxième auteur. J'ai réalisé toutes les manipulations ainsi que la rédaction de la partie biologique sous la direction de mon directeur, le Pr. Charles Ramassamy. Le Dr Rabanel, Jean-Michel et l'étudiant Jimmy Faivre ont réalisé la synthèse et la caractérisation physicochimiques des formulations sous la direction de leurs co-encadreurs, les Prs Hildgen, Patrice et Banquy, Xavier. Tous les auteurs ont participé à la révision et aux corrections des reviseurs.

Article : Effect of polymer architecture on Curcumin 1 encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: toward a drug delivery nano-platform to the CNS



Research Paper

Effect of polymer architecture on curcumin encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: Toward a drug delivery nano-platform to the CNS



Jean-Michel Rabanel^{a,b,1}, Jimmy Faivre^{a,1}, Ghislain Djiokeng Paka^c, Charles Ramassamy^c, Patrice Hildgen^b, Xavier Banquy^{a,*}

^a Canada Research Chair on Bio-inspired Materials and Interfaces, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

^b Laboratoire de Nanotechnologie Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

^c INRS-Institut Armand-Frappier, 531, Boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2015

Revised 31 July 2015

Accepted in revised form 6 September 2015

Available online 25 September 2015

Keywords:

Poly(lactic)
Poly(ethylene glycol)
Comb-polymer
Nanoparticle
Micelle-like
Nanoaggregate
Curcumin
Toxicity
ROS
CNS

ABSTRACT

We developed a nanoparticles (NPs) library from poly(ethylene glycol)–poly lactic acid comb-like polymers with variable amount of PEG. Curcumin was encapsulated in the NPs with a view to develop a delivery platform to treat diseases involving oxidative stress affecting the CNS. We observed a sharp decrease in size between 15 and 20% w/w of PEG which corresponds to a transition from a large solid particle structure to a “micelle-like” or “polymer nano-aggregate” structure. Drug loading, loading efficacy and release kinetics were determined. The diffusion coefficients of curcumin in NPs were determined using a mathematical modeling. The higher diffusion was observed for solid particles compared to “polymer nano-aggregate” particles. NPs did not present any significant toxicity when tested *in vitro* on a neuronal cell line. Moreover, the ability of NPs carrying curcumin to prevent oxidative stress was evidenced and linked to polymer architecture and NPs organization. Our study showed the intimate relationship between the polymer architecture and the biophysical properties of the resulting NPs and sheds light on new approaches to design efficient NP-based drug carriers.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Neurodegenerative disorders (NDD) are an increasing burden for the health systems and among all NDD, Alzheimer disease (AD) represents the most common disease. Besides the complexity of the pathophysiology of these diseases, NDD and AD are also particularly difficult to treat due to the limited permeability of the blood–brain barrier (BBB). Indeed, the BBB is very efficient to prevent the entry of foreign compounds in the central nervous system (CNS), thanks to a very tight endothelial structure and the action of efflux pumps [1,2]. Moreover, the drugs available for the treatment of AD are in limited number and are symptomatic drugs associated with unwanted peripheral secondary effects. Finally, considering the number of mechanisms involved in AD progression, delivery of compounds with pleiotropic properties is a promising strategy. For instance, several studies have pointed out that curcumin, a

phyto-polyphenol with anti-oxidative, anti-inflammatory activities and low toxicity, could alter several mechanisms involved in AD such as the amyloid-beta cascade, the phosphorylation of Tau protein as well as the development of oxidative stress [3]. However, curcumin brain bioavailability is low due to its poor stability in physiological media [4] and poor permeability across the BBB [5,6].

Curcumin encapsulation in nanocarriers has been extensively studied for different therapeutic applications, mainly in an effort to bypass the BBB but also to improve its solubility limitation and chemical instability. Liposomes, micelles, lipids or albumin particles [3,7–9], as well as polyester-based carriers [5,10] and poly(cyanoacrylate) based carriers [11] have been proposed to deliver curcumin and other substances to the CNS. Curcumin encapsulated in PLGA NPs showed an increased accumulation in CNS tissues compared to free curcumin [12].

Nanoparticle-mediated efficient uptake of active substances into the CNS represents the new field of nanomedicine with great challenge and could represent a major breakthrough in the management of different CNS disorders. Although several proofs of concept have been put forward, the main goal stays elusive, mainly for reasons

* Corresponding author. Tel.: +1 514 343 2102; fax: +1 514 343 2470.

E-mail address: xavier.banquy@umontreal.ca (X. Banquy).

¹ These authors contributed equally to this work.

linked to the dose levels actually delivered, accumulation of polymeric material in the host, more complex cellular environment and interspecies differences between models [13]. Among those reasons, one that has been clearly underestimated is the structural properties of the particle. The relationships between the polymer architecture and the resulting NP structural organization are still a matter of debate in spite of several decades of research. In the area of pharmaceutical polymeric nanocarrier, diblock polymers are the most commonly used polymers to form NPs [14,15]. On the other hand, few systematic studies focusing on establishing the relationship between the polymer architecture and the performances of the nano-carriers in terms of encapsulation efficiency, release profile and more generally drug efficacy, are available.

The ability of PEGylated NP to penetrate into the brain tissue through the BBB is still a matter of debate. It is well established that drug carriers must be PEGylated in order to circulate for an extended period of time in the blood stream and to provide enough time to the different transport mechanisms to improve NP brain accumulation. “Naked” NPs are usually rapidly opsonized resulting in an increase of liver uptake and macrophage elimination. This strongly decreases their distribution in other organs and tissues, including brain tissues. The influence of PEGylation on the BBB crossing mechanisms is not well documented yet. It has been reported that PEGylated poly(alkylcyanoacrylate) NP penetrate the brain tissues more efficiently than any other nanoformulation using other surface modifications [14,16]. The specific crossing of a non-compromised BBB (in absence of brain injury or inflammation creating gaps between endothelial cells) involves passage through a layer of endothelial cells via endocytosis, lysosomal escape and exocytosis on the brain parenchyma side [17,18]. Modification of NP surface properties using polymers such as Poloxamer®, polysorbates and PEG has been shown to favor adsorption of serum ApoE on the NP surface [13]. ApoE can be used as a targeting ligand allowing translocation of the NP across the BBB via the ApoE receptor present on endothelial cell surfaces [7]. The effect of PEG surface densities and PEG surface organization on BBB crossing efficiency is not well documented. To our knowledge, systematic exploration of these parameters is yet to be conducted.

Considering the often opposite properties a NP has to display for a successful clinical outcome [19], the development of innovative polymer architectures is necessary to maximize the efficacy of delivery to the CNS. We previously developed a library of polymers based on a comb-like architecture exhibiting a backbone of polylactic acid with pendant polyethylene glycol chains. We showed that by systematically varying the amount of PEG in the polymer, we were able to control the NP structure from solid particles to soft, polymer nano-aggregate or “micelle-like” particles [20].

In this work, we used this library of PEG-g-PLA polymers to prepare nano-vectors loaded with curcumin. The effect of polymer architecture on the structure of the particle, drug encapsulation efficiency, drug loading, the drug release and its modeling taking in account curcumin degradation, were studied. The suitability of these NPs for antioxidant delivery was evaluated on a neuronal cell line. This work represents the first step toward the development of an efficient drug delivery system to the CNS. Moreover, our library of NP with a systematic variation of PEG content and PEG surface densities may provide a tool to explore the role of PEG in the NP crossing of the BBB.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The synthesis of the different polymers used in this study was described elsewhere [20]. Briefly, random copolymerization of

D,L-dilactide and benzyl glycidyl ether (BGE) was performed by ring-opening polymerization catalyzed by stannous 2-ethyl hexanoate (SnOct₂). The BGE/lactic acid ratio was varied from 0.5% to 3% to yield PLA chains with different densities of benzyl pendant moieties. Alcohol pendant groups were deprotected by catalytic hydrogenation in presence of Pd/Carbon to yield OH-g-PLA. mPEG-COOH (2kD) was grafted onto OH-g-PLA polymers by acylation to yield PEG-g-PLA (polymer A and C in Fig. 1). Alternatively, the mPEG-COOH chains were grafted by esterification in presence of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) [21]. The diblock synthesis (PEG-*b*-PLA, polymer B in Fig. 1) was performed as follow: mPEG-OH 2kD was used as a macro-initiator during the ring-opening polymerization of dilactide in presence of SnOct₂ as previously described [20]. Polymer properties obtained from GPC and ¹H NMR are summarized in Table 1.

All chemicals were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON Canada) unless otherwise stated in the text. Solvents were from Fisher Scientific (Fisher Canada, ON). Curcumin was obtained from AK scientific (AK Scientific, Union City, CA, USA). SK-N-SH cells which are human neuroblastoma cells, were from ATCC (Manassas, VA, USA), and cell culture media, minimal essential medium Eagle (MEM), fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, and sodium pyruvate were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). LDH and Tox-8 detection kits were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON Canada).

2.2. NPs fabrication and purification

NP batches were prepared by nanoprecipitation. Briefly, 60 mg of PEGylated polymer was dissolved in 3 mL acetone. For drug-loaded NP batches, curcumin was added to the organic phase at a determined curcumin/polymer ratio (from 0 to 20% w/w). The organic phase was slowly injected with a syringe pump (Kent Scientific Corp. Torrington, CT, USA) at a rate of 1 mL/min with a 26G needle in 15 mL of PBS 10 mM (pH 7.4) placed in a 25 mL beaker. The aqueous phase was kept under constant stirring (530 rpm) with a magnetic agitator during the injection of the organic phase.

NPs were purified by centrifugation on a tabletop centrifuge (Multi RF centrifuge, Thermo Electron Corp. Needham Heights, MA, USA) to remove eventual large debris, aggregates and precipitated non-encapsulated curcumin (5 min at 5000 rpm). Supernatant was finally dialyzed against PBS during 2 h in a regenerated cellulose membrane bag, with a cutoff of 6–8000 Da (SpectraPor, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA) to remove organic solvent residuals as well as small non-precipitated polymer chains. NPs were stored in a dark container at 4 °C or were used immediately after preparation. Residual amount of non-encapsulated curcumin in solution is rapidly degraded in the aqueous phase during NP suspension storage and is thus not contributing to observed biological properties.

2.3. NPs characterization

- **Size measurements:** The NPs size was measured by Dynamic Light Scattering (DLS) on a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcester, UK). Three measurements of 15 (10 s) runs were performed at 25 °C and averaged.
- **Zeta potential measurements:** NPs suspended in 1 mL of PBS 0.1 X pH 7.4 were placed in a disposable folded capillary cell to measure ζ on a Malvern Zetasizer (Malvern, Worcester, UK) in triplicate.
- **Loading efficiency (LE) and drug loading (DL):** LE and DL were assessed by UV/Vis spectrophotometry (MBI Lab equipment, Montréal, CA) using a standard curve of curcumin in dichloromethane (DCM) at $\lambda_{\max} = 419$ nm. Briefly, 1 mL of NPs was

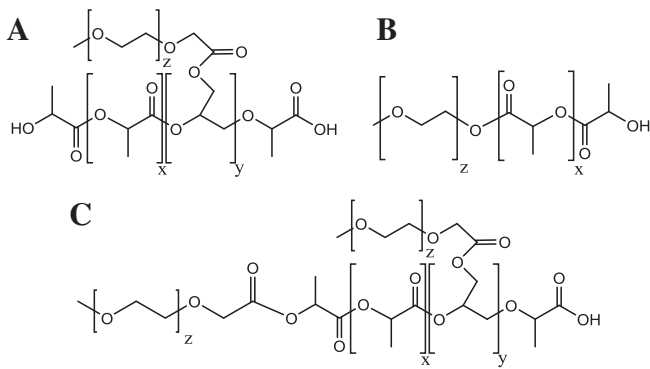


Fig. 1. Structures of the polymers used in this study. (A) PEG-g-PLA; (B) PEG-PLA di-block polymer; (C) PEG-g-PLA with a terminal PEG graft. ($z = 45$; $y = 0.5\text{--}2.5/100$ LA monomers).

lyophilized and precisely weighted, then dissolved in DCM. Dissolved polymers effect on absorbance was found not significant. Curcumin concentration was then measured by UV/Vis. LE and DL were calculated using Eqs. (1) and (2) respectively:

$$LE = \frac{\text{weight of curcumin in NPs}}{\text{initial weight of curcumin}} \times 100 \quad (1)$$

$$DL = \frac{\text{weight of curcumin in NPs}}{\text{weight of NPs}} \times 100 \quad (2)$$

NP exact weights were adjusted for the presence of PBS salts in samples.

2.4. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC experiments were performed on blank and loaded NPs. A mass of about 5 mg of freeze-dried (blank or drug-loaded) NP was disposed in crimped aluminum pan. DSC analysis was performed under nitrogen flow from $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, hold for 1 min and cooled at a rate of $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ and reheated to $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. First run was analyzed for NP samples using TA instruments Universal Analysis 2000, version 4.5A (TA Instruments – Waters LLC, USA).

2.5. Transmission electronic microscopy (TEM)

2.5.1. Sample preparation for TEM

Diluted NP suspension in MilliQ[®] water at a concentration of about 1–2 mg/mL was deposited on a carbon film of 400 square mesh copper grids (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). The volume of the droplet was about 2–4 μL . The droplet was allowed to sit for 5 min before excess of liquid was drained-

out with filter paper. Grids were allowed to dry in air for 1–2 h before image acquisition. No staining procedure was introduced.

2.5.2. TEM imaging

TEM image acquisition was done in bright field mode on a JEM-2100F, Field Emission electron microscope (Jeol Ltd, Tokyo, Japan) equipped with a sample holder cooled by liquid nitrogen (Gatan Inc. Warrendale, Pittsburg, PA, USA). The grids were maintained at $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ throughout the acquisition with a temperature controller (Smart Set Model 900 Cold Stage controller; Gatan Inc. Warrendale, Pittsburg, PA, USA). The grids were introduced in the microscope column under vacuum. Liquid nitrogen was added to the sample holder and temperature recorded. The sample was exposed to the electron beam only after the temperature had reached $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$. The acceleration voltage was set at 200 kV. Images were digitally recorded at a low electron dose to prevent damage to the heat-sensitive particles (current densities were between 5 and 15 pA/cm^2).

2.6. Drug release studies

Release studies were carried out in triplicate using the dialysis bag method at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in an orbital shaker. In brief, 3 mL of NPs suspension was placed in a dialysis bag (Cellulose ester membrane, cutoff 100 kDa, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA) and then, immersed in 30 mL of 10 mM PBS (pH 7.4) supplemented with 50 mM Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) to increase curcumin solubility in the release medium and insure sink conditions. Ascorbic acid (ASA) was also added to the medium (25 μM) to minimize curcumin oxidation. At each time-point, 3 mL of external media was removed and replaced by fresh solution. The curcumin solution was dosed by UV/Vis spectrophotometry according to a standard curve of curcumin in a 10 mM PBS/SDS/ASA buffer at $\lambda_{\text{max}} = 422\text{ nm}$.

2.7. In vitro studies

In vitro studies were carried out as described previously [22] with some modifications described here. Briefly, SK-N-SH cells were maintained in MEM, supplemented with 10% v/v FBS, 100 U/mL penicillin, 100 g/mL streptomycin, and sodium pyruvate (1 mM) in a humidified incubator at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ with 5% CO_2 . Cells were grown to 80% confluence and then seeded in multi-well cell culture plates.

2.7.1. Cytotoxicity assays

SK-N-SH cells were plated at a density of 2.0×10^4 cells/well in 96-well plates and incubated for 24 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cells were then treated with free curcumin, blank NP or curcumin-loaded NP in presence or absence of H_2O_2 (250 μM) ($n = 3$). Curcumin solutions are prepared as follow to avoid precipitation: A stock solution of 200 μM is prepared by the solubilization of 1 mg of curcumin in 0.5 mL of Ethanol and the volume is completed with 13 mL of PBS. This stock solution was used to prepare solution of free curcumin in all biological tests. Control experiments (not shown in this study) had previously showed that this procedure had not effect on biological results [10]. Preparation of blank or curcumin-loaded NP, characterized for their size, mass concentration and drug loading, were diluted to obtain 0.25–1 μM curcumin equivalent concentration in either blank or curcumin-loaded NP samples. Practically, the same concentration of particles was used in experiments involving blank and loaded NPs. This allows for a direct comparison and control of NP effects, to be distinguished from curcumin effects. Cell death and survival were measured 24 h after the treatment using the cytotoxicity detection kit-LDH and the survival detection kit Tox-8 (Resazurin-based) respectively.

Table 1
Polymer properties (from [20]).

Polymer	Molar mass, M_w		%PEG (% w/w)	Structure
	PLA (g/mol)	PEG (g/mol)		
OH-g-PLA	23,990	–	0	–
PEG-PLA	23,000	2000	6	B
PEG 8%-g-PLA	28,300	2000	8	A
PEG 12%-g-PLA	40,300	2000	11.6	A/C
PEG 15%-g-PLA	33,890	2000	14.9	A/C
PEG 20%-g-PLA	19,820	2000	19.9	C
PEG 25%-g-PLA	23,990	2000	24.9	C
PEG 38%-g-PLA	28,300	2000	37.9	C

The kits were used following the manufacturer's instructions. Values obtained from controls, untreated cells, were considered as 100% of proliferation for Resazurin-based assays. For cell mortality assays (LDH-based assays) and ROS level determination (DCF-DA assays), values obtained from controls untreated cells were considered as 0% effect on mortality, while values obtained from control untreated cells exposed to 250 μM H_2O_2 were considered as 100% effect on mortality. Raw results from treated cells were thus normalized based on these controls to allow a direct comparison of the different treatments and account for cell-assays variability from plate to plate.

2.8. Effect of Reactive Oxygen Species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS)

Effect of NPs on intracellular ROS and RNS as well as protective effect of blank and drug loaded NPs on neuronal cells in presence or absence of 250 μM H_2O_2 was assessed by following the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) a non-fluorescent, cell permeable dye that, upon hydrolysis by intracellular esterase, reacts with ROS/RNS to produce a highly fluorescent compound, 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), which is trapped inside the cells. Briefly, SK-NSH cells (2×10^4 /well) were plated into 96-well plates. After 24 h, cells were exposed with 10 μM DCF-DA for 20 min and treated with free curcumin, blank NP or curcumin-loaded NP for 1 h in presence or absence of H_2O_2 . At the end of the treatment, cells were then washed with PBS containing $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ and the fluorescence was determined with the excitation/emission filters at 485/535 nm using a Synergy HT multi-detection microplate reader (BioTek Instruments, Inc, Highland Park, Winooski, Vermont, USA).

ROS level determination (DCF-DA assays), values obtained from controls untreated cells were considered as basal level (0%), while values obtained from controls untreated cells exposed to 250 μM H_2O_2 were considered as the 100% effect on ROS levels. Raw results from treated cells were thus normalized based on these controls to allow a direct comparison of the different treatments and account for cell-assays variability from plate to plate.

2.9. Statistical analysis

Multiple groups comparison of cell-based assays was performed with a one-way Anova on SigmaStats[®] (Systat Software Inc.) using the Holm–Sidak method. Significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Polymer characteristics

The polymers used in this study, noted as PEG-g-PLA throughout the text, are comb-like polymers composed of a PLA backbone on which PEG chains are grafted. In addition to PEG-g-PLA polymers, PLA polymer bearing no PEG chain (OH-g-PLA) as well as a PEG-b-PLA di-block polymer was included to the study in order to better characterize the effect of PEG content and architecture. The polymers' architectures are presented in Fig. 1. The properties of the polymer used in this study are listed in Table 1.

PEG chains ($M_w = 2000$ g/mol) were grafted on a PLA backbone of $M_w \approx 25,000$ g/mol (Table 1). The resulting polymers exhibited a PEG content varying from 8 to 37.9% w/w (Table 1). The choice of the PLA backbone size was determined by its appropriate short degradation time [23]. Numbers of grafted PEG chains on polymeric chain were determined by ^1H NMR [20].

3.2. NP preparation and characterization

NP made with different curcumin contents (% w/w ratio curcumin/polymer varying from 0% to 20%) in the organic phase was prepared by nanoprecipitation and characterized. Except for NPs prepared with OH-g-PLA, curcumin-loaded NP showed no significant size differences compared to blank NPs (Fig. 2a). This observation is in agreement with Budhian et al. who encapsulated haloperidol in PLA-based nanoparticles and found that NPs mean diameter was independent of the initial haloperidol content [24]. Similar observations were made by Gou et al. in a work involving encapsulation of curcumin in a micellar system [25].

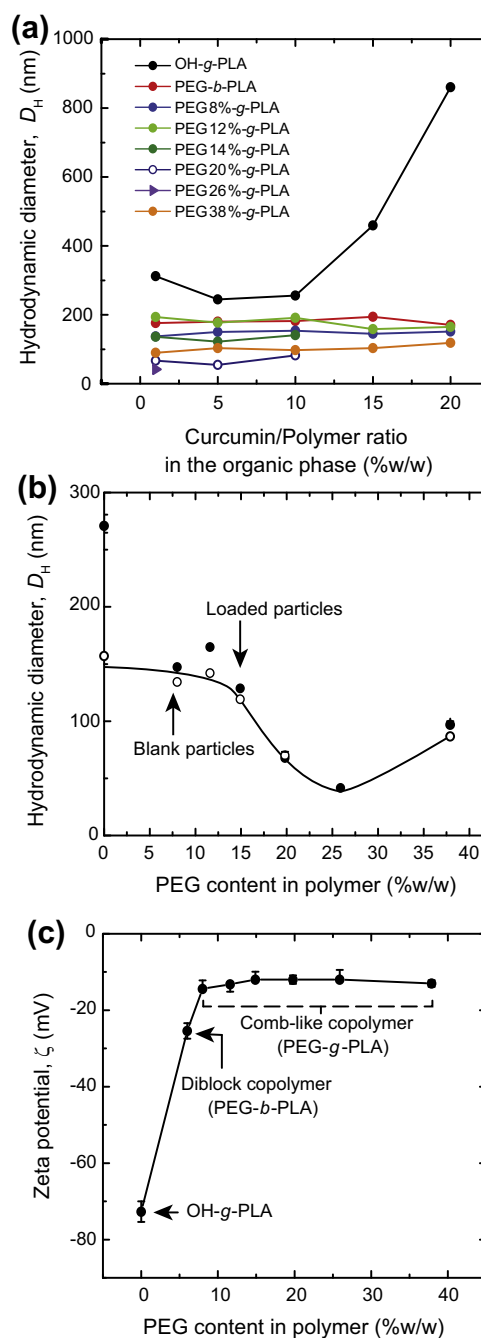


Fig. 2. Particle hydrodynamic diameter as a function of: (a) initial curcumin/polymer content in the organic phase (% mass); or (b) PEG content. (c) Zeta potential of the NPs as a function of polymer PEG content. In (a) and (b) some error-bars are not showing since they are smaller than the symbol used.

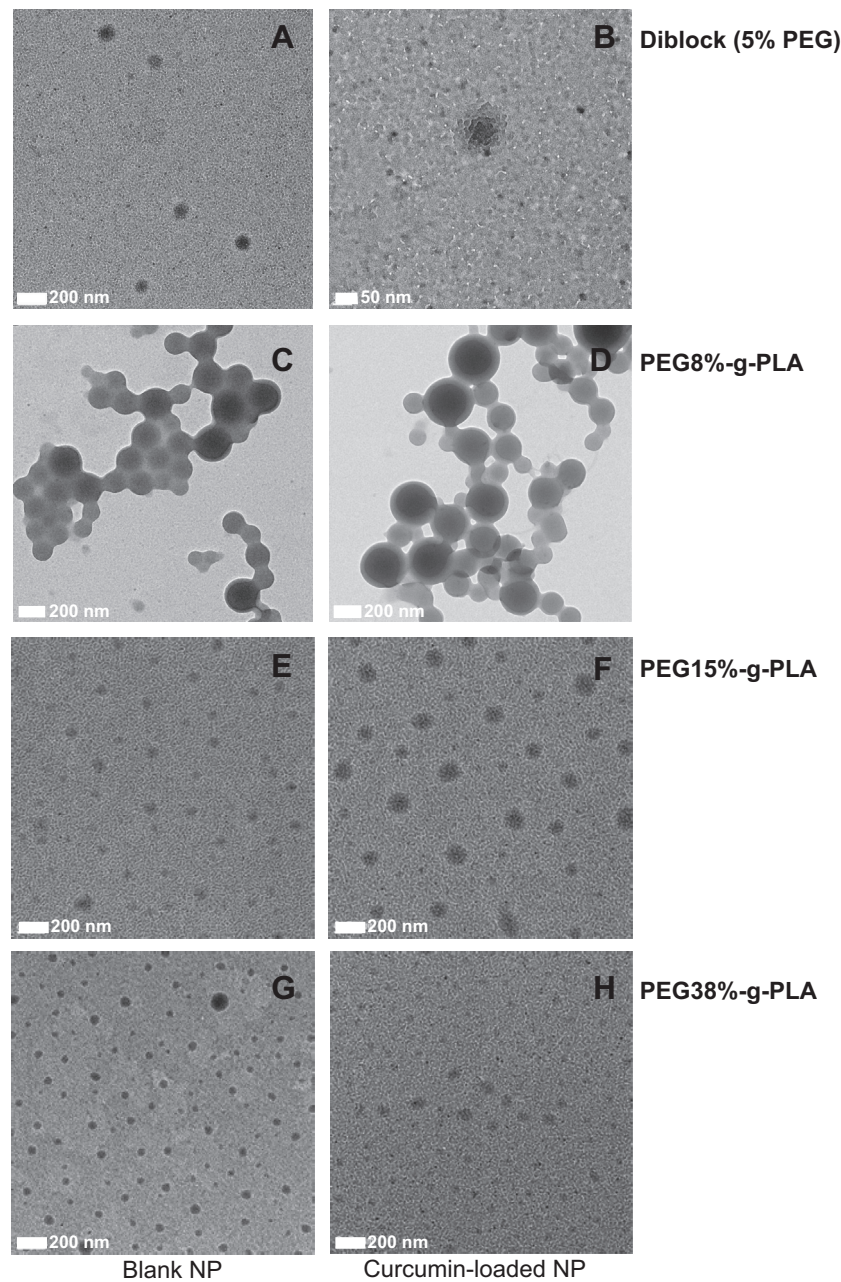


Fig. 3. Representative TEM images of the NPs under study. On left panels: blank particles; on the right panel: curcumin-loaded particles. Acquisition at 15,000 \times , except (B) acquisition at 25,000 \times . (A and B) Diblock PEG-*b*-PLA NPs; (C and D) PEG 8%-*g*-PLA NPs; (E and F) PEG 15%-*g*-PLA NPs; (E and F) PEG 38%-*g*-PLA NPs.

Fig. 2b shows the evolution of the NPs hydrodynamic diameter as a function of PEG content in the polymer (% w/w PEG/PLA). NPs size was found to be constant and independent of PEG content up to 15% w/w PEG. Above this value, a sharp decrease in size is observed to about 50 nm at 25% w/w PEG/PLA. Afterward, NPs hydrodynamic diameters increase again slowly, up to 100 nm with increasing PEG content (Fig. 2b). This increase could be due to the higher surface PEG chain density resulting in stretched PEG chains and increase in particle hydrodynamic diameter, as predicted by De Gennes' theory [26]. Similar observations were reported for this polymer library previously for blank NPs [20].

OH-*g*-PLA NPs (NPs made of polymer before it has been modified by PEG grafting) showed a different behavior when prepared with a ratio of 15% w/w curcumin/polymer. The colloidal system was instantaneously destabilized, resulting in a drastic NP hydrodynamic diameter increase. It can be hypothesized that,

when OH-*g*-PLA is used, curcumin precipitation occurred much faster than the polymer precipitation and particles formation. As a result, curcumin precipitation drags down polymer chains leading to the complete destabilization of the system. On the other hand, PEG side chains in di-block and comb-like copolymers contribute to the nano-suspension stabilization.

NPs zeta potential was also studied as a function of PEG content in polymer (Fig. 2c). OH-*g*-PLA NPs exhibited a strongly negative zeta potential of -75 mV providing a strong electrostatic repulsion in aqueous solution between PLA particles. The presence of PEG chains on PLA backbone decreases drastically zeta potential to a value of -15 mV. However this decrease remained independent of the polymer PEG content. NPs produced with the diblock polymer exhibited a zeta potential slightly more negative compared to NPs obtained with comb-like polymers. The dramatic decrease in zeta potential with increased PEG content has been also

reported by Gref et al. [27]. Such phenomenon has been attributed to the displacement of the shearing plane far away from NPs surface by the presence of PEG chains around the NPs, hiding the carboxylic groups present in the PLA core. However, low electrostatic repulsions for PEG-*g*-PLA NPs are counterbalanced by the increased steric hindrance around PEGylated NPs which guarantees a stable colloidal suspension. The difference between diblock and PEG-*g*-PLA zeta potentials can be explained by the smaller PEG/PLA ratio used in the diblock copolymer (Table 1) which decreases the PEG density around corresponding NPs. Another explanation can be related to the structural organization of comb polymer preventing PLA terminal COOH to be exposed at the NP surface [20].

Morphology of blanks and drug-loaded particles was examined by TEM. To prevent damage or deformation of the NPs, TEM grids were maintained at $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ during image acquisition. No structural differences were noticeable between blank and curcumin-loaded particles (Fig. 3). Between 0 and 12–15% w/w of PEG, NPs appear to belong to a particulate (solid particle) regime and the size of the hydrophobic core determined the NPs size. Between 0 and 12–15% w/w of PEG, NPs appear as solid particles. NPs with a 8% PEG content (Fig. 3C and D), as well as control NPs prepared from pure PLA or OH-*g*-PLA, (Fig. S2) exhibits a large particle size and a homogeneous core.

Beyond 15% of PEG content, it was hypothesized that nanocarriers switch to a “micellar-like” or “polymer nano-aggregate” structural organization, a kinetically micellar frozen system (Fig. 3E–H) in response to increased PEG content per polymeric chain [20]. All polymer nano-aggregate particles appeared round shaped and non-aggregated.

The changes in particle size previously observed by DLS were confirmed by TEM. Particles with PEG content below 12% w/w were found to be much larger ($>100\text{ nm}$) than those with higher PEG content ($<100\text{ nm}$). Interestingly, our results show that the transition from solid NPs to polymer aggregate NPs depends only on the PEG content in the polymer and its architecture but not on the molecule encapsulated in the NPs, since no difference was observed between curcumin-loaded-NP and blank NP. Noteworthy, the morphology of diblock NP appears more spherical and less polydispersed than particles made from comb polymer of similar PEG content. The dramatic change in size and particle morphology from solid polymeric NPs to soft polymeric aggregates is not only related to polymer PEG content but also to polymer architecture as PEG-*b*-PLA diblock with PEG content about 6% adopts a soft particle morphology as seen in TEM (Fig. 3A and B).

3.3. Curcumin encapsulation

Systematic quantification of the loading efficiency (LE) and the drug loading (DL) of curcumin in the NPs were conducted to correlate these properties with the architecture and PEG content of the polymers. Fig. 4 shows the evolution of the LE and DL as a function of the initial curcumin/polymer ratio in the organic phase.

LE was found to vary between nearly 0% for OH-*g*-PLA NPs, 20% for solid particles and up to 50% for the polymer nano-aggregate NPs. For DL, values spread out from 0% for OH-*g*-PLA to 5% for polymer nano-aggregate NPs. As a result, these NPs exhibiting the highest PEG content were found to have the highest values of LE and DL. As shown in Fig. 4, LE exhibited a plateau before drastically decreasing to values lower than 10% at 20% w/w curcumin/polymer (Fig. 4a). At the same time, the DL first increased up to a maximum value, which depends on the polymer PEG content, before decreasing (with the exception of PEG 8%-*g*-PLA (Fig. 4b). Budhian et al. reported a similar behavior for the encapsulation of haloperidol in PLA based-NPs [24,28]. The authors explained this phenomenon as the result of the drug/polymer interactions. By increasing the curcumin initial content, the encapsulation yield

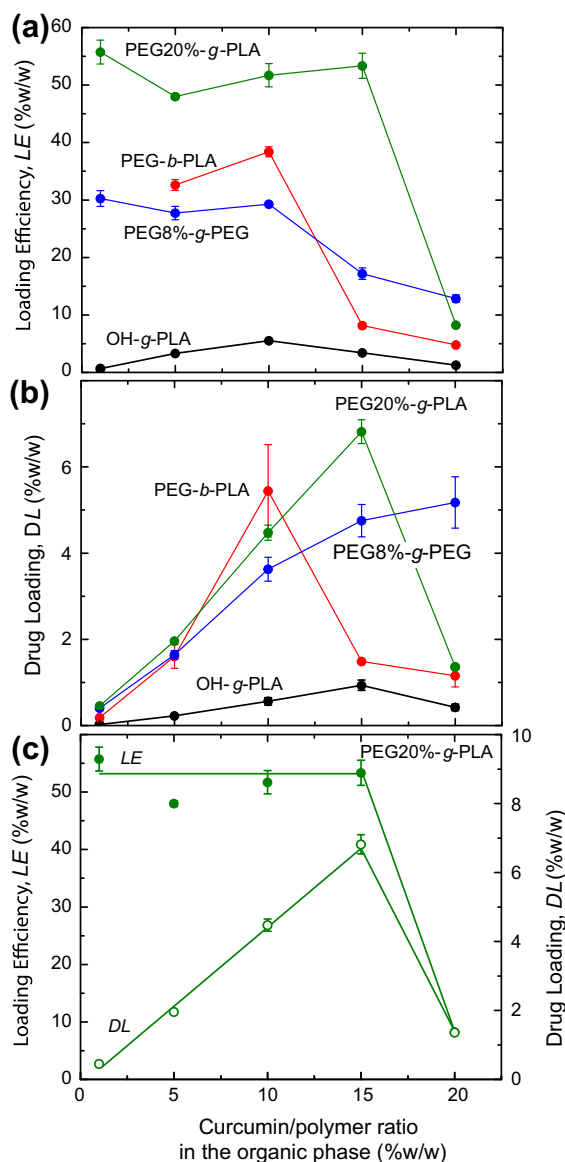


Fig. 4. Optimization of encapsulation process: (a) loading efficiency (LE) as a function of curcumin/polymer ratio; (b) drug loading (DL) as a function of curcumin/polymer ratio; (c) direct comparison of loading efficiency and drug loading (DL) as a function of curcumin/polymer ratio for “polymer nano-aggregate” particle made of PEG 20%-*g*-PLA.

(LE) remains at the maximum efficiency as indicated by the plateau, and the drug loading (DE) increases until it reaches its maximum, which can be considered as the drug maximum solubility in the polymeric matrix (Fig. 4c). Beyond this limit, LE drastically decreases due to drug saturation in the NPs. It follows that curcumin concentration in the aqueous phase increases and reaches rapidly its saturation in solution and precipitates. The non-encapsulated curcumin precipitate drags down polymer chains, destabilizing the system and resulting in a dramatic decrease in DL [29].

The NPs ability to encapsulate curcumin was also correlated with NPs hydrodynamic diameter (Fig. 5). The highest values of LE and DL were obtained for the smallest nanocarriers with a LE of about 50% (Fig. 5a) and a DL of about 5% (Fig. 5b). Both LE and DL decrease with the particle size to reach values close to 0% for NPs produced with OH-*g*-PLA polymer (i.e. PLA chain with hydroxyl branching points along the polymer backbone). Noteworthy, the size of particle is also directly correlated with PEG content.

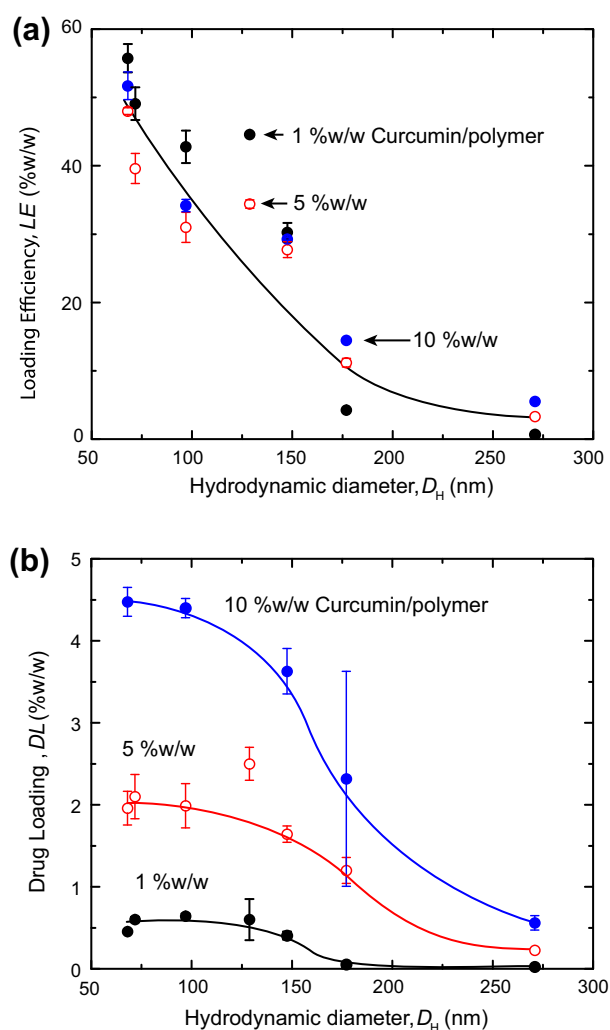


Fig. 5. Evolution of (a) loading efficiency (LE) and (b) drug loading (DL) as a function of the NPs hydrodynamic diameter.

Although curcumin is poorly soluble in PEG, NP PEG content could play a role in LE and DL values. For instance, PLGA nanoparticles prepared with PEO-PPG, an amphiphilic molecule known to cover the surface of the NPs, were shown to be more efficient to encapsulate curcumin than “bare” PLGA NPs [30].

The relationship between polymer architecture, PEG content and encapsulation properties can be summarized as follows: The increase of PEG content is related to an increase in LE. Noteworthy PEG-*b*-PLA with a 6% PEG content showed a higher LE than PEG 8%-*g*-PLA comb polymer pinpointing the role of polymer architecture. The maximum DL is about 4–6% regardless of the PEG content. For each polymer, the maximum DL is obtained at different drug/polymer ratio as seen in Fig. 4b. This may be related to three factors: (1) solubility of curcumin in polymer, mainly the hydrophobic PLA backbone chains present in variable amount in each polymer; (2) the relative precipitation speed between the polymer chains and curcumin as discussed above, and finally (3) a retention effect of curcumin inside the NP due to the hydrophilic PEG layer.

The encapsulation efficiency depends on drug/polymer interactions [29], the structural organization of the NP and the preparation process of the NP. During the nanoprecipitation process, a key factor is the relative rate of precipitation of the hydrophobic drug and the polymer. If the rates of precipitation of the two species are equal, they will form homogeneous particles while large differences between rates will force the selective precipitation of

each component and disfavor the encapsulation of the drug. The rate of precipitation of the polymer is mainly controlled by its PEG content, being lower at high PEG content.

Regarding the role of the interactions between the drug and the polymer, in our case, the strong affinity of the drug to the PLA backbone of the polymer is due to hydrophobic forces. As shown in our previous study [20], NPs obtained from polymers of high PEG content tend to exhibit more hydrophobic central cores compared to lightly PEGylated NPs. As PEG content increases in the polymer, it becomes more segregated to the surface of the NPs during the fabrication process which allows, to a certain extent, to improve drug solubility in the core of the NPs. On the other hand, the increased density of the PEG layer on the surface of the NP impedes to some extent curcumin release during the encapsulation process during release experiments as observed in our experimental data. These points are further discussed in light of release and diffusion study results (Section 3.4).

3.4. Curcumin release and stability studies

Release studies were carried out using the same initial curcumin content in NPs over 1 week. Because quantity of encapsulated curcumin in pure PLA NP was so small, it was not possible to dose any release with the detection method used (UV absorbance). This formulation was removed from the release studies. Fig. 6a shows representative release profiles of curcumin from NPs suspended in PBS supplemented with SDS and ascorbic acid at 37 °C. Ascorbic acid was used as an anti-oxidant to prevent curcumin degradation [30] and SDS was added to increase the solubility of curcumin in the aqueous media and ensure sink conditions [31]. Release profiles followed trends independently of the PEG content in the NPs (Fig. 5a). During the first 24 h of release, a fast increase of curcumin concentration is observed followed by an exponential decrease over more than 48 h to reach the detection limit of curcumin released. The apparent decrease of curcumin concentration is due to its degradation by oxidation besides the presence of ascorbic acid. Curcumin is known to be unstable in several aqueous media with a degradation of 90% in 30 min in PBS 100 mM [4,32].

In order to quantify curcumin degradation during the release studies, degradation kinetics were quantified in the same media than release studies, at two different concentrations. In these conditions, the degradation kinetics showed a first order degradation rate with a constant k_d equal to 0.01 h^{-1} (see Fig. S1) and a degradation of 50% after 3 days at 37 °C. With the purpose to obtain more insights on the effect of polymer architecture and PEG content on curcumin release, a simple diffusion–degradation model was fitted to the experimental data (Eq. (3)) [33].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \exp(-k_d \cdot t) - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \cdot \exp\left(-\frac{D \cdot n^2 \cdot \pi^2 \cdot t}{r^2}\right) \quad (3)$$

where M_t and M_∞ are the released mass of curcumin at time t and time infinite respectively, D is the diffusion coefficient of curcumin in the NPs and r is the NP radius (see Table S1 for the list of calculated modeling parameters). The first term in the equation accounts for the degradation of curcumin while the second term models the Fickian diffusion of the drug from spherical particles [34]. We ensured that the assumptions of the diffusion model, namely: (1) perfect sink conditions of curcumin in release media, (2) solubility concentration higher than drug concentration within the NP matrix, (3) no swelling, degradation, surface and bulk erosion of the copolymer during the release timeframe, were verified experimentally. As mentioned already, sink conditions were fulfilled thanks to SDS addition which increases curcumin solubility in the release media [31]. TEM pictures were examined and DSC analyses were

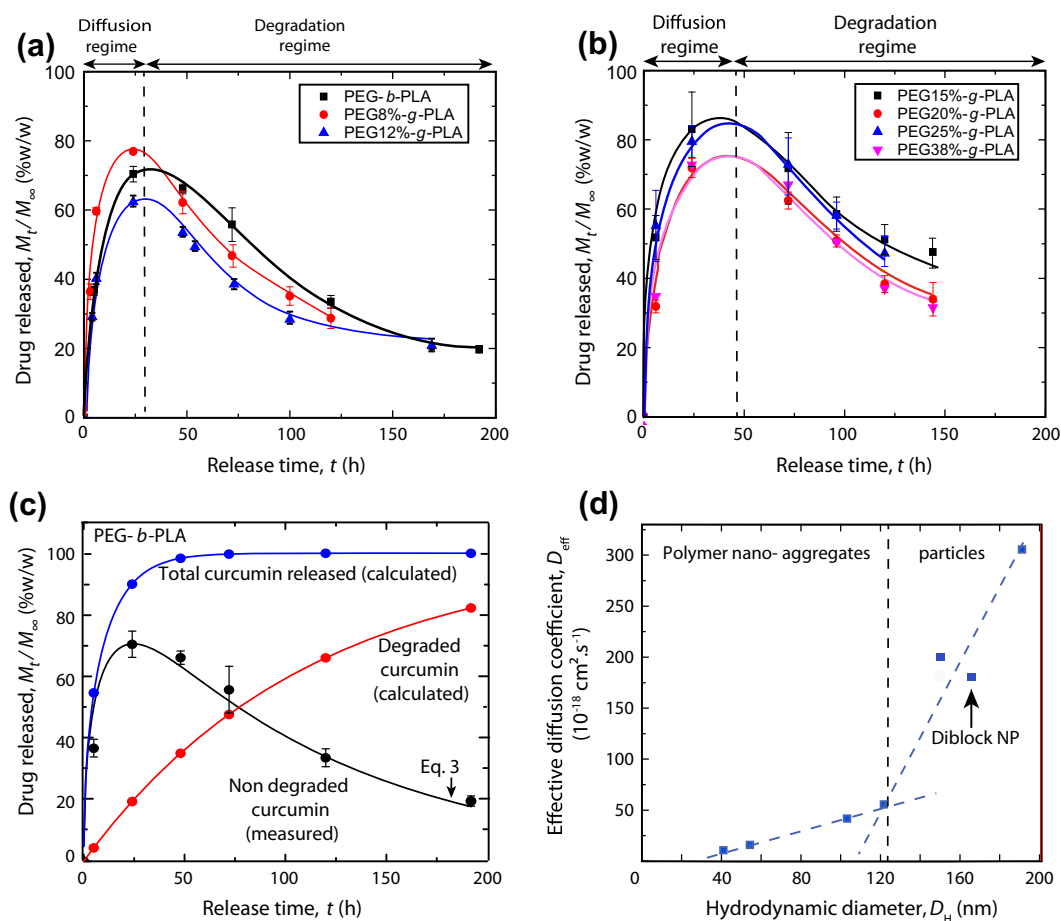


Fig. 6. Representative release profiles of curcumin at 37 °C from (a) solid NP and (b) “micelle-like” or “polymer nano-aggregate” NPs. (c). Modeling of curcumin release from diblock NPs, showing the evolution with time of the purely diffusive and drug degradation contributions. (d) Dependence of the drug diffusion coefficient D obtained using Eq. (3) on NP size.

performed to identify the presence of any crystallized areas in the NPs, which could suggest that curcumin concentration was higher than its solubility in the NP. It was found that the polymeric matrix was homogenous and no fusion peak appeared on the DSC thermograms, suggesting curcumin solubilization in the polymeric matrix (data not shown). Moreover, encapsulated curcumin has no apparent effect on polymer thermal properties (t_g) and thus their organization within the NPs (Fig. S3). Right after the release experiments, absence of polymer degradation and bulk erosion in curcumin-loaded NP material were verified by GPC and DLS size measurements respectively (data not shown) supporting a model for which drug diffusion is the limiting factor of the release. This is not unexpected as it has been reported previously that erosion plays a minor role in drug release from diblock polyesters-PEG NPs [35].

Eq. (3) was used to obtain the diffusion coefficient of curcumin in the NPs. The diffusion coefficient (D) was set as the sole free parameter. It was then possible to estimate the theoretical curcumin release without its degradation (Fig. 6c top curve). Results revealed that the diffusion coefficient in the largest NPs was about 10 times higher than in the smallest NPs (Fig. 6d). One possible explanation in the difference between the diffusion constant of the different particle batches could be linked to the surface density and thickness of PEG outside layer creating a diffusion barrier to the very hydrophobic curcumin molecule in the smaller particles. Peracchia et al. were the first to report a slowing down of the drug release from polymeric NP having a surface PEG coating. Moreover, they showed that this effect was surface PEG density and PEG chain length dependent [35]. Another explanation could come from the

internal structure differences between particles of different size. For instance, porosity may be higher in large particle compared to nanoparticles favoring hydration of the particle core and release of their content [36]. This hypothesis is also in agreement with Budhian et al. who measured a higher diffusion coefficient of haloperidol encapsulated in 1.3 μm PLA/PLGA micro-particles (without PEG chains corona) compared to 450 nm NPs and to 220 nm NPs [24]. On the other hand, diffusion through the polymer matrix can be favored by low polymer t_g or by a molecularly dispersed drug as seen by DSC for all the NPs tested.

The PEG content and polymer architecture play a role not only in the determination of NP structure but on drug encapsulation and release. The drug release profiles (Fig. 6a and b) and diffusion constants as calculated during release modeling show two regimes, related in part to the size of the NP (Fig. 6d). They are also related to the NP morphologies observed, i.e. solid particles (NP made with comb-polymers with low PEG content) and polymer nano-aggregate particles (NP made of comb-polymers with high PEG content and diblock polymer) (see Fig. S4, plotting D_{eff} against the NP morphology). Relatively large but “soft” diblock NPs appear in an intermediate position in terms of drug diffusion (Fig. 6d), highlighting the role of polymer architecture.

3.5. In vitro studies

3.5.1. Cytotoxicity studies

To test the protective properties of the curcumin-loaded NPs against oxidative stress, we performed two separate tests using

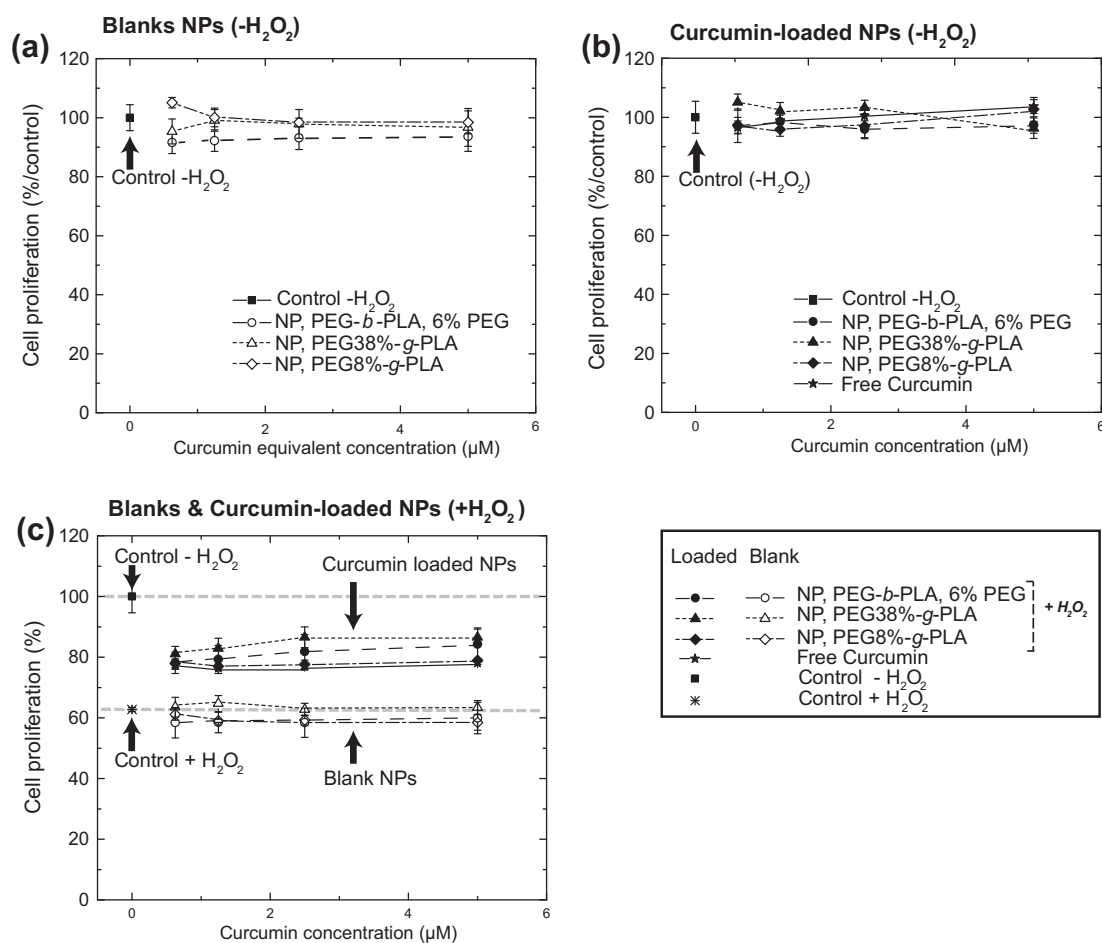


Fig. 7. Cytotoxicity as assessed by the Resazurin – cell viability assay of blank NPs (a) and curcumin-loaded NPs (b) on SK-N-SH neuronal cells. Panel (c) shows Resazurin – cell proliferation assay in presence of H₂O₂ (250 μM) in the medium. Particle concentrations were adjusted to curcumin concentrations (or equivalent for blank NP): For blank NP, abscises are expressed in curcumin concentration for comparison purpose. Practically, an equivalent quantity of drug-loaded NP in blank NP is added for each curcumin concentration levels.

resazurin test and LDH assay respectively. Resazurin test allows the monitoring of cell proliferation and metabolism, while LDH assay monitors change in cell membrane integrity.

Di-block NP (5% PEG w/w), comb-polymer PEG-*g*-PLA at 8% and 38% PEG content (% w/w) were tested in cell culture model as representative of solid particle and nano-aggregate NP batches. Resazurin test, a cell proliferation assay confirmed the absence of adverse effects on cell proliferation and metabolism in the range of tested concentrations for both blank and curcumin-loaded particles (Fig. 7a and b). In the presence of hydrogen peroxide (Fig. 7c), cell survival was reduced by 40% and 20% with blank NPs and Cur-NP, respectively.

These results demonstrate that encapsulated curcumin was efficient to protect cells against hydrogen peroxide oxidative stress. But on the other hand there is only a partial preservation of cell proliferation and metabolism upon addition of curcumin-loaded NP. Moreover, we found no clear dose–response relationship showing an increase of cell proliferation and metabolism upon addition of higher curcumin dose. This result could be put in perspective with the curcumin release kinetic in regard to the condition of the assays performed here, as discussed in the following section.

LDH assays did not reveal any evidence of cytotoxicity for blank (Fig. 8a) and curcumin-loaded NPs (Fig. 8b) of any batches of NPs on neuronal cell line SK-N-SH. These tests demonstrate that, independently of their size, polymer architecture and PEG content, the NPs under study are clearly not cytotoxic to neuronal cells.

In assays involving addition of H₂O₂, as expected, an increase in cell mortality (measured by LDH released in the medium) is observed in controls experiments (Fig. 8). Noteworthy, NP toxicity was not exacerbated by induction of oxidative stress upon addition of H₂O₂ in the medium (Fig. 8a). The addition in the media of the blank NP did not affect the release of LDH in the media (Fig. 8a). This indicates that NPs themselves are not able to counteract cell mortality induced by hydrogen peroxide. This is an important control as seemingly non-specific effect of blank NP has been reported and attributed to the properties of NP to carry serum proteins to the cells in culture and induce change in cell proliferation and mortality [37].

On the other hand, curcumin-loaded NP appeared to have a significant effect under the tested conditions (Fig. 8b), particularly for the di-block NP (5% w/w PEG). However the magnitude of the effect is comparable to free curcumin added to the media (no statistical differences between the groups, $p > 0.05$).

3.5.2. Reactive Oxygen Species production and inhibitions

The direct measurement of intracellular ROS was performed by DCF fluorescence dosage. The control experiments with blank NP show little or no effect on intracellular ROS concentration (Fig. 9a). No statistically significant scavenging effect was observed for blank particles (upper curves in Fig. 9a). On the other hand, curcumin-loaded NPs showed a dose–response decrease on intracellular ROS levels (Fig. 9b). At the highest tested concentrations,

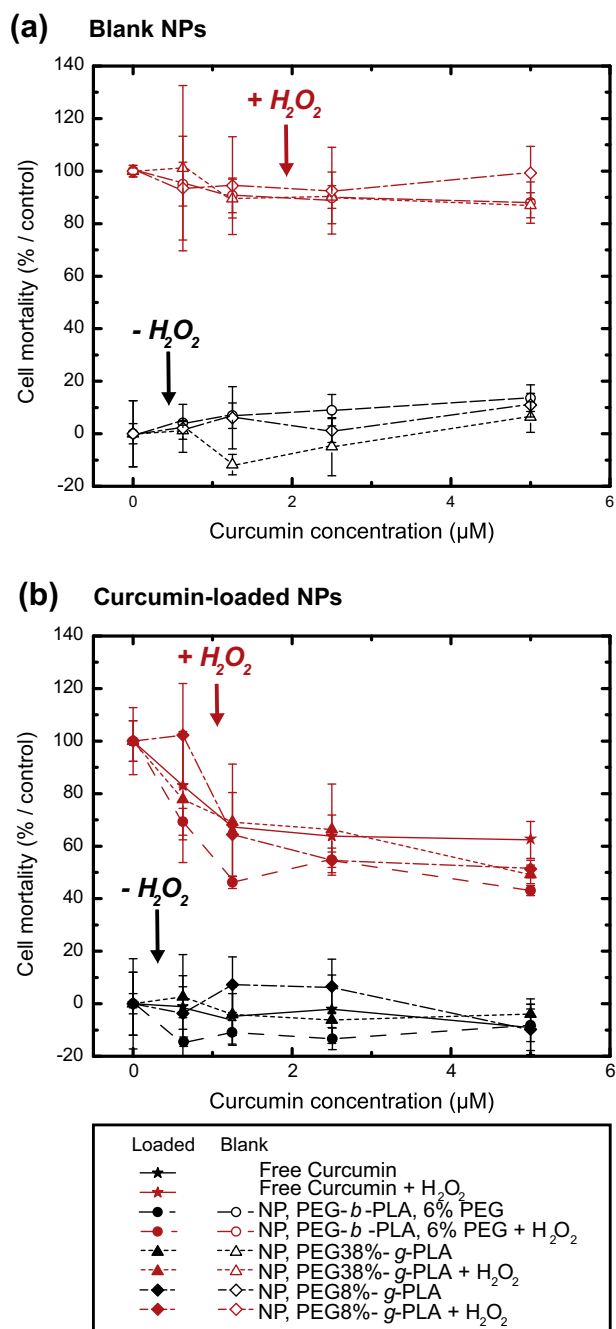


Fig. 8. Relative LDH release assay (cell mortality assay). (a) Controls experiments with blank NP. (b) Curcumin-loaded NP with (symbol in red) or without (symbol in black) addition of H_2O_2 in the medium. The level of LDH release induced by H_2O_2 without treatment has been considered as 100%. For blank NP, abscise is expressed in curcumin concentration for comparison purpose. Practically, an equivalent quantity of drug-loaded NP in blank NP is added for each curcumin concentration levels. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

di-block loaded NP and polymer nano-aggregate loaded particles were able to restore ROS level to a level comparable to untreated cells, while loaded solid NPs (PEG 8%-*g*-PLA) appear to be less efficient to counteract the elevation of ROS (Fig. 9b). The di-block and nano-aggregate NPs were found to be as effective as free curcumin, as no statistically significant difference between free curcumin, curcumin-loaded di-block or polymer nano-aggregate particles was found (Fig. 9b). The difference in effects of each curcumin-loaded NPs batches on ROS levels (Fig. 9b, may arise from the size

of the NP, the rate of release, site of release (extra or intracellular release) and the possible interaction with cells.

All these results should be correlated with the kinetic of drug release by these NPs. Fig. 6a shows a superior release for high PEG content NP compared to low PEG content NP. A faster release of curcumin should translate into greater scavenging effect considering the conditions of these experiments. Within the time frame of the experiment (1 h) the curcumin dose encapsulated into the NP is only partially released (about 25–35% of the dose as seen in Fig. 6a and b), limiting its scavenging effect. Moreover the released content is exposed to degradation in the medium and the cytosol, decreasing the effective dose at a given time point.

The polymer architecture controls the drug release (as seen in Section 3.4) and modulates exposure of curcumin to ROS (Fig. 9). In spite of PEG-*b*-PLA NPs and PEG 38%-*g*-PLA NPs differences in hydrodynamic diameters and PEG content, they appear as effective

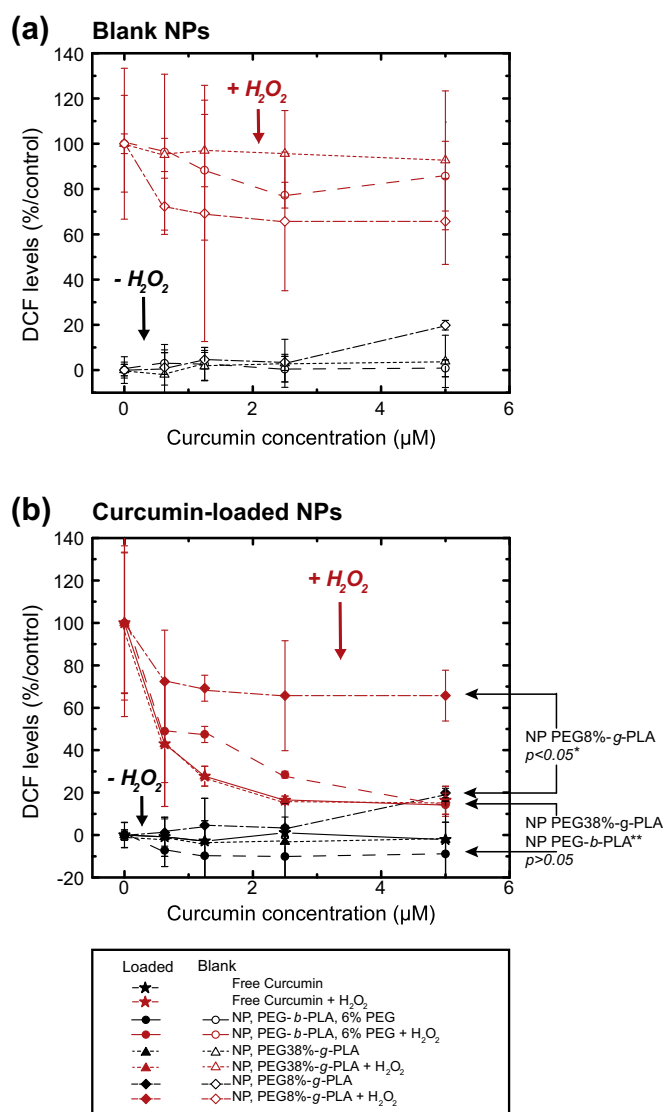


Fig. 9. Relative intracellular levels of ROS (a) Control experiments with blank NP (blank NP concentration equivalent to concentration of curcumin-loaded NP) without addition of H_2O_2 (black symbol) or with H_2O_2 (250 μM added to the medium) (red symbol); (b) treatment experiments: level of ROS as determined by DCF detection in response to treatment with curcumin-loaded NP without addition of H_2O_2 (black symbol) or with H_2O_2 (250 μM added to the medium) (red symbol). The level of ROS induced after H_2O_2 addition without treatment has been considered as 100%. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

to decrease intracellular ROS levels. On the other hand, PEG-*b*-PLA and PEG 8%-*g*-PLA NPs with similar size and similar PEG content show large difference in scavenging efficacy.

3.5.3. Polymeric NP toxicity

Induction of oxidative stress effects by NPs has been reported mostly for silica or metal oxides NPs (inorganic) as well as carbon nanotubes and carbon particulates generated by pollution. The type of stress reported can go from damages to proteins by reactive NPs surface, to the generation of oxygen reactive species or to the depletion of the medium from antioxidant molecules [38]. Even if these effects were reported for organic NPs [10,22,39], few studies on polymeric NP toxicity address this issue. In the conditions of the test, however, we did not detect any effect of di-block and polymer nano-aggregate NPs, either blank or drug-loaded on the generation of intracellular ROS (Fig. 9b). A minor effect on ROS level is observed for solid NP (NP made from PEG 8%-*g*-PLA) at the higher dose (5 μ M curcumin or equivalent) as seen in Fig. 9a and b. This effect on ROS levels is not correlated with cell mortality as shown in Fig. 8a and b depicting LDH release in the medium and its origin is unknown at this time.

3.5.4. Discussion summary

This work showed the intimate relationship between the polymer architecture, block composition and the biophysical properties of the resulting NPs. We previously identified a transition of physico-chemical properties of NP made of PEG branched PLA around 15% PEG content (w/w) [20]. In this study, drug encapsulation and release properties are found to also follow this trend as shown by encapsulation results (Fig. 4), release profiles (Fig. 6) and notably biological effects (Fig. 9). The increase of PEG content is related to an increase in LE (Fig. 4). On the other side, PEG-*b*-PLA diblock with a 6% PEG content showed a higher LE than PEG 8%-*g*-PLA comb polymer illustrating the role of architecture. The drug release profiles (Fig. 6a and b) and diffusion constants show two regimes, related in part to the size of the NP (Fig. 6d) and the NP morphologies observed, i.e. solid particles (NP made with comb-polymers with PEG content <15%) and polymer nano-aggregates (NP made of comb-polymers with PEG content >15% and diblock polymer). Relatively large but “soft” diblock NPs appear in an intermediate position in terms of drug diffusion coefficient (Fig. 6d), highlighting again the role of polymer architecture on the NPs inner structure and fluidity. Finally, polymer architecture controls and modulates exposure of curcumin to ROS and thus antioxidant activity. Diblock polymer and high PEG content comb polymers appeared to be the most efficient to reduce oxidative stress (Fig. 9). In this study we have limited our investigation to copolymers of PEG 2kD chains and hydrophobic PLA backbones of almost constant molecular weight. The information we gathered from the comb-like polymers library in comparison with diblock PEG-*b*-PLA and PLA only suggests that both PEG content and polymer architecture (i.e. the position at which PEG chains are attached to the hydrophobic backbone) play a role in the NP properties. PEG content appears determinant for particle size, while architecture seems determinant for the structural organization of the particle (solid NPs vs nanoaggregates). This aspect was extensively discussed in a previously published work describing the polymer synthesis and characterization of blank NPs [20]. All together these results contribute to shed light on new approaches to design efficient polymer-based drug carriers.

4. Conclusion

A library of PEGylated grafted PLA polymers were used in order to establish correlations between physico-chemical properties of the NPs and curcumin encapsulation and release properties of

the said particles. A structural transition, described previously for several particle properties, located around 15% PEG content (% w/w) and suggesting a transition from a solid particle regime to a micelle-like behavior, was also found for release properties of curcumin. This transition initially identified in terms of structural properties, seems related to changes in encapsulation and release properties of loaded curcumin as well.

Release studies and mathematical modeling of curcumin taking into account degradation were designed to fit the experimental data and to estimate the real release. Cell-based assays support the non-toxicity of the particles to neuronal cell lines. Moreover, oxidation scavenging effects of curcumin-loaded NP show the potential benefit of those formulations for oxidative-stress-related CNS diseases. Di-block and micelle like NPs were found as effective as free curcumin in the condition of the experiments. However, NP formulation may prove to be superior on long term effect thanks to their protective effect on curcumin and slow release properties. This aspect will be addressed in future studies. PEGylated polymeric particle may also have therapeutic benefit by themselves in AD by their effect on amyloid aggregation [40]. This assumption has to be clarified by further studies in our system. Lastly, another point to be explored is the optimization of the blood brain barrier crossing of different formulation with the view to develop *in vivo* assays.

Acknowledgments

JMR wish to thank the “Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologie” (Québec, Canada) and the Faculty of Pharmacy of the Université de Montréal for doctoral fellowships. XB acknowledges the support of Canada Research Chair Program of the government of Canada, PH acknowledges FRQ-NT funding and CR support from “Chaire de recherche Louise et André Charron sur la maladie d’Alzheimer” of INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada. Technical assistance of Johanne Habr in encapsulation studies as well as the help of Soudeh F. Tehrani in polymer synthesis is acknowledged. TEM imaging was performed at the Centre de Caractérisation Microscopique des Matériaux (CM²) of the École Polytechnique (Montréal, QC, Canada) with the help of Jean-Philippe Massé.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.09.004>.

References

- [1] M.M. Patel, B.R. Goyal, S.V. Bhadada, J.S. Bhatt, A.F. Amin, Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery, *CNS Drugs* 23 (2009) 35–58, <http://dx.doi.org/10.2165/0023210-200923010-00003>.
- [2] J.M. Rabanel, V. Aoun, I. Elkin, M. Mokhtar, P. Hildgen, Drug-loaded nanocarriers: passive targeting and crossing of biological barriers, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 3070–3102.
- [3] J.K. Sahni, S. Doggui, J. Ali, S. Baboota, L. Dao, C. Ramassamy, Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer’s disease, *J. Control. Release* 152 (2011) 208–231.
- [4] Y.-J. Wang, M.-H. Pan, A.-L. Cheng, L.-I. Lin, Y.-S. Ho, C.-Y. Hsieh, J.-K. Lin, Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1867–1876.
- [5] A. Mathew, T. Fukuda, Y. Nagaoka, T. Hasumura, H. Morimoto, Y. Yoshida, T. Maekawa, K. Venugopal, D.S. Kumar, Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 peptide for potential use in Alzheimer’s disease, *PLoS One* 7 (2012) e32616.
- [6] A. Belkacemi, S. Doggui, L. Dao, C. Ramassamy, Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease, *Expert Rev. Mol. Med.* 13 (2011) (null-null).
- [7] A. Zensi, D. Begley, C. Pontikis, C. Legros, L. Mihoreanu, S. Wagner, C. Buchel, H. von Briesen, J. Kreuter, Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones, *J. Control. Release* 137 (2009) 78–86.

- [8] M. Taylor, S. Moore, S. Mourtas, A. Niarakis, F. Re, C. Zona, B. La Ferla, F. Nicotra, M. Masserini, S.G. Antimisiaris, M. Gregori, D. Allsop, Effect of curcumin-associated and lipid ligand-functionalized nanoliposomes on aggregation of the Alzheimer's Abeta peptide, *Nanomed.* 7 (2011) 541–550.
- [9] L. Gastaldi, L. Battaglia, E. Peira, D. Chirio, E. Muntoni, I. Solazzi, M. Gallarate, F. Dosio, Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: current state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87 (2014) 433–444.
- [10] S. Doggui, J.K. Sahni, M. Arseneault, L. Dao, C. Ramassamy, Neuronal uptake and neuroprotective effect of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the human SK-N-SH cell line, *J. Alzheimers Dis.* 30 (2012) 377–392.
- [11] R.S. Mulik, J. Mönkkönen, R.O. Juvonen, K.R. Mahadik, A.R. Paradkar, 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.* 7 (2010) 815–825.
- [12] Y.-M. Tsai, C.-F. Chien, L.-C. Lin, T.-H. Tsai, Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood–brain barrier penetration, *Int. J. Pharm.* 416 (2011) 331–338.
- [13] J. Kreuter, Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know?, *Adv Drug Deliv. Rev.* 71 (2014) 2–14.
- [14] K. Andrieux, P. Couvreur, Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for delivery of drugs across the blood–brain barrier, *Wiley Interdisciplinary Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* 1 (2009) 463–474.
- [15] J. Hrkach, D. Von Hoff, M.M. Ali, E. Andrianova, J. Auer, T. Campbell, D. De Witt, M. Figa, M. Figueiredo, A. Horhota, S. Low, K. McDonnell, E. Peeke, B. Retnarajan, A. Sabnis, E. Schnipper, J.J. Song, Y.H. Song, J. Summa, D. Tompsett, G. Troiano, T. Van Geen Hoven, J. Wright, P. LoRusso, P.W. Kantoff, N.H. Bander, C. Sweeney, O.C. Farokhzad, R. Langer, S. Zale, Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile, *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) 128ra139.
- [16] P. Calvo, B. Gouritin, H. Villarroya, F. Eclancher, C. Giannavola, C. Klein, J.P. Andrieux, P. Couvreur, Quantification and localization of PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles in brain and spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis in the rat, *Eur. J. Neurosci.* 15 (2002) 1317–1326.
- [17] S. Wohlfart, S. Gelperina, J. Kreuter, Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles, *J. Control. Release* 161 (2012) 264–273.
- [18] H. Hillaireau, P. Couvreur, Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 2873–2896.
- [19] J.-M. Rabanel, P. Hildgen, X. Banquy, Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation, *J. Control. Release* 185 (2014) 71–87.
- [20] J.-M. Rabanel, J. Faivre, S. Tehrani, A. Lalloz, P. Hildgen, X. Banquy, Effect of polymer architecture on the structural and biophysical properties of PEG–PLA nanoparticles, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 10374–10385.
- [21] B. Neises, W. Steglich, Simple method for the esterification of carboxylic acids, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 17 (1978) 522–524.
- [22] S. Doggui, A. Belkacemi, G.D. Paka, M. Perrotte, R. Pi, C. Ramassamy, Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways, *Mol. Nutr. Food Res.* 57 (2013) 1660–1670.
- [23] M.S. Shive, J.M. Anderson, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28 (1997) 5–24.
- [24] A. Budhian, S.J. Siegel, K.I. Winey, Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content, *Int. J. Pharm.* 336 (2007) 367–375.
- [25] M. Gou, K. Men, H. Shi, M. Xiang, J. Zhang, J. Song, J. Long, Y. Wan, F. Luo, X. Zhao, Z. Qian, Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy in vitro and in vivo, *Nanoscale* 3 (2011) 1558–1567.
- [26] P.G. de Gennes, Polymers at an interface; a simplified view, *Adv. Colloid Interface Sci.* 27 (1987) 189–209.
- [27] R. Gref, G. Miralles, E. Dellacherie, Polyoxyethylene-coated nanospheres: effect of coating on zeta potential and phagocytosis, *Polym. Int.* 48 (1999) 251–256.
- [28] J. Panyam, M.M. Dali, S.K. Sahoo, W. Ma, S.S. Chakravarthi, G.L. Amidon, R.J. Levy, V. Labhasetwar, Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles, *J. Control. Release* 92 (2003) 173–187.
- [29] K. Letchford, R. Liggins, H. Burt, Solubilization of hydrophobic drugs by methoxy poly(ethylene glycol)-block-polycaprolactone diblock copolymer micelles: Theoretical and experimental data and correlations, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 1179–1190.
- [30] L. Mayol, C. Serri, C. Menale, S. Crispi, M.T. Piccolo, L. Mita, S. Giarra, M. Forte, A. Saija, M. Biondi, D.G. Mita, Curcumin loaded PLGA–poloxamer blend nanoparticles induce cell cycle arrest in mesothelioma cells, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93 (2015) 37–45.
- [31] H.H. Tønnesen, Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions. Studies of curcumin and curcuminoids, XXVIII, *Pharmazie* 57 (2002) 820–824.
- [32] S. Oetari, M. Sudibyo, J.N.M. Commandeur, R. Samhoedi, N.P.E. Vermeulen, Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver, *Biochem. Pharmacol.* 51 (1996) 39–45.
- [33] J. Siepmann, F. Siepmann, Mathematical modeling of drug delivery, *Int. J. Pharm.* 364 (2008) 328–343.
- [34] D.Y. Arifin, L.Y. Lee, C.-H. Wang, Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: implications to drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1274–1325.
- [35] M.T. Peracchia, R. Gref, Y. Minamitake, A. Domb, N. Lotan, R. Langer, PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: investigation of their drug encapsulation and release characteristics, *J. Control. Release* 46 (1997) 223–231.
- [36] S. Sant, V. Nadeau, P. Hildgen, Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles, *J. Control. Release* 107 (2005) 203–214.
- [37] R. Hussien, B.H. Rihn, H. Eidi, C. Ronzani, O. Joubert, L. Ferrari, O. Vazquez, D. Kaufer, G.A. Brooks, Unique growth pattern of human mammary epithelial cells induced by polymeric nanoparticles, *Physiological Rep.* 1 (2013) (n/a-n/a).
- [38] P. Møller, N.R. Jacobsen, J.K. Folkmann, P.H. Danielsen, L. Mikkelsen, J.G. Hemmingsen, L.K. Vesterdal, L. Forchhammer, H. Wallin, S. Loft, Role of oxidative damage in toxicity of particulates, *Free Radic. Res.* 44 (2010) 1–46.
- [39] A. Aranda, L. Sequedo, L. Tolosa, G. Quintas, E. Burello, J.V. Castell, L. Gombau, Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells, *Toxicol. In Vitro* 27 (2013) 954–963.
- [40] D. Brambilla, R. Verpillot, B. Le Droumaguet, J. Nicolas, M. Taverna, J. Kona, B. Lettiero, S.H. Hashemi, L. De Kimpe, M. Canovi, M. Gobbi, V. Nicolas, W. Scheper, S.M. Moghimi, I. Tvaroska, P. Couvreur, K. Andrieux, PEGylated nanoparticles bind to and alter amyloid-beta peptide conformation: toward engineering of functional nanomedicines for Alzheimer's disease, *ACS Nano* 6 (2012) 5897–5908.

RÉFÉRENCES

- Abbott NJ & Revest PA (1991) Control of brain endothelial permeability. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews* 3(1):39-72.
- Acharya SR & Reddy PRV (2016) Brain targeted delivery of paclitaxel using endogenous ligand. *Asian J Pharm Sci* 11(3):427-438.
- Aderem A & Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 17:593-623.
- Akterin S, Cowburn RF, Miranda-Vizuete A, Jimenez A, Bogdanovic N, Winblad B & Cedazo-Minguez A (2006) Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in beta-amyloid toxicity and Alzheimer's disease. *Cell death and differentiation* 13(9):1454-1465.
- Amann LC, Gandal MJ, Lin R, Liang Y & Siegel SJ (2010) In vitro-in vivo correlations of scalable PLGA-risperidone implants for the treatment of schizophrenia. *Pharm Res* 27(8):1730-1737.
- Amarnath Sharma USS (1997) Liposomes in drug delivery: progress and limitations *International journal of pharmaceutics* 154:123-140.
- Andrieux K & Couvreur P (2012) [Nanoparticles for brain delivery of drugs or contrast agents. Application to Alzheimer's disease]. *Biologie aujourd'hui* 206(3):185-190.
- Ankrum JA, Miranda OR, Ng KS, Sarkar D, Xu CJ & Karp JM (2014) Engineering cells with intracellular agent-loaded microparticles to control cell phenotype. *Nat Protoc* 9(2):233-245.
- Aoyama K, Suh SW, Hamby AM, Liu J, Chan WY, Chen Y & Swanson RA (2006) Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nature neuroscience* 9(1):119-126.
- Arodin L, Lamparter H, Karlsson H, Nennesmo I, Bjornstedt M, Schroder J & Fernandes AP (2014) Alteration of thioredoxin and glutaredoxin in the progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 39(4):787-797.
- Arranz-Gibert P, Guixer B, Malakoutikhah M, Muttenthaler M, Guzman F, Teixido M & Giralt E (2015) Lipid bilayer crossing--the gate of symmetry. Water-soluble phenylproline-based blood-brain barrier shuttles. *J Am Chem Soc* 137(23):7357-7364.
- Arsland D & Laake K (1996) [Should Alzheimer disease be treated with tacrine? Review of the literature]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke* 116(23):2791-2794.
- Athanasiou KA, Niederauer GG & Agrawal CM (1996) Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17(2):93-102.
- Banquy X, Leclair G, Rabanel JM, Argaw A, Bouchard JF, Hildgen P & Giasson S (2008) Selectins ligand decorated drug carriers for activated endothelial cell targeting. *Bioconjugate chemistry* 19(10):2030-2039.

- Bareford LM & Swaan PW (2007) Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 59(8):748-758.
- Barenholz Y (2012) Doxil (R) - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J Control Release* 160(2):117-134.
- Barichello JM, Morishita M, Takayama K & Nagai T (1999) Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm* 25(4):471-476.
- 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. *Journal of clinical psychopharmacology* 28(1):110-113.
- Belkacemi A, Doggui S, Dao L & Ramassamy C (2011) Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. *Expert reviews in molecular medicine* 13:e34.
- Belkacemi A & Ramassamy C (2012) 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 & medicine* 52(3):593-600.
- Benmerah A & Lamaze C (2007) Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic* 8(8):970-982.
- Bertrand N, Leclair G & Hildgen P (2007) Modeling drug release from bioerodible microspheres using a cellular automaton. *International journal of pharmaceutics* 343(1-2):196-207.
- Bertrand N & Leroux JC (2012) The journey of a drug-carrier in the body: an anatomophysiological perspective. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 161(2):152-163.
- Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N & Farokhzad OC (2014) Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews* 66:2-25.
- Bickel U, Yoshikawa T & Pardridge WM (2001) Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Advanced drug delivery reviews* 46(1-3):247-279.
- Biedler JL, Helson L & Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research* 33(11):2643-2652.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M & Freedman LS (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research* 38(11 Pt 1):3751-3757.
- Bockenhoff A, Cramer S, Wolte P, Knieling S, Wohlenberg C, Gieselmann V, Galla HJ & Matzner U (2014) Comparison of five peptide vectors for improved brain delivery of the lysosomal enzyme arylsulfatase A. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34(9):3122-3129.
- Bodmeier R & McGinity JW (1987) The preparation and evaluation of drug-containing poly (D-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *Pharm Res* 4(6):465-471.

- Bouligand J, Couvreur P, Layre AM, Deroussent A, Paci A, Delain E, Vassal G & Gref R (2007) Busulphan-loaded long-circulating nanospheres, a very attractive challenge for both galenists and pharmacologists. *Journal of microencapsulation* 24(8):715-730.
- Braak H & Braak E (1991) Neuropathological Staging of Alzheimer-Related Changes. *Acta neuropathologica* 82(4):239-259.
- Brambilla D, Nicolas J, Le Droumaguet B, Andrieux K, Marsaud V, Couraud PO & Couvreur P (2010) Design of fluorescently tagged poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for human brain endothelial cell imaging. *Chem Commun (Camb)* 46(15):2602-2604.
- Bruckmann S, Brenn A, Grube M, Niedrig K, Holtfreter S, Und Halbach OV, Groschup M, Keller M & Vogelgesang S (2016) Lack of P-glycoprotein Results in Impairment of Removal of Beta-Amyloid and Increased Intraparenchymal Cerebral Amyloid Angiopathy after Active Immunization in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*.
- Cabezón I, Manich G, Martín-Venegas R, Camins A, Pelegri C & Vilaplana J (2015) Trafficking of Gold Nanoparticles Coated with the 8D3 Anti-Transferrin Receptor Antibody at the Mouse Blood-Brain Barrier. *Molecular pharmaceutics* 12(11):4137-4145.
- Carroll RT, Bhatia D, Geldenhuys W, Bhatia R, Miladore N, Bishayee A & Sutariya V (2010) Brain-targeted delivery of Tempol-loaded nanoparticles for neurological disorders. *Journal of drug targeting* 18(9):665-674.
- Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck MP & Fenart L (2007) Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nature reviews. Drug discovery* 6(8):650-661.
- Chang J, Paillard A, Passirani C, Morille M, Benoit JP, Betbeder D & Garcion E (2012) Transferrin adsorption onto PLGA nanoparticles governs their interaction with biological systems from blood circulation to brain cancer cells. *Pharmaceutical research* 29(6):1495-1505.
- Chatellier G & Lacomblez L (1990) Tacrine (tetrahydroaminoacridine; THA) and lecithin in senile dementia of the Alzheimer type: a multicentre trial. Groupe Français d'Etude de la Tetrahydroaminoacridine. *BMJ* 300(6723):495-499.
- Chaudhury A & Das S (2011) Recent Advancement of Chitosan-Based Nanoparticles for Oral Controlled Delivery of Insulin and Other Therapeutic Agents. *Aaps Pharmscitech* 12(1):10-20.
- Chaudhury S, Agarwal C, Pandey AK, Aher VT, Panicker L, Ramagiri SV, Bellare JR & Goswami A (2011) Counter-ions diffusion properties of silica embedded poly(perfluorosulfonic) acid membrane. *J Membrane Sci* 382(1-2):262-270.
- Chen CC & Borden MA (2010) Ligand Conjugation to Bimodal Poly(ethylene glycol) Brush Layers on Microbubbles. *Langmuir* 26(16):13183-13194.
- Cherreddy KK, Coco R, Memvanga PB, Ucakar B, des Rieux A, Vandermeulen G & Pr at V (2013) Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. *Journal of Controlled Release* 171(2):208-215.
- Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG & Frangioni JV (2007) Renal clearance of quantum dots. *Nature biotechnology* 25(10):1165-1170.

- Chonn A, Cullis PR & Devine DV (1991) The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J Immunol* 146(12):4234-4241.
- Chrestensen CA, Starke DW & Mieyal JJ (2000) Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 275(34):26556-26565.
- Cirrito JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB, Jiang H, Prior JL, Sagare A, Bales KR, Paul SM, Zlokovic BV, Piwnica-Worms D & Holtzman DM (2005) P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of clinical investigation* 115(11):3285-3290.
- Colombo M, Mazzucchelli S, Collico V, Avvakumova S, Pandolfi L, Corsi F, Porta F & Prosperi D (2012) Protein-Assisted One-Pot Synthesis and Biofunctionalization of Spherical Gold Nanoparticles for Selective Targeting of Cancer Cells. *Angew Chem Int Edit* 51(37):9272-9275.
- Conner SD & Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927):37-44.
- Coskun PE, Beal MF & Wallace DC (2004) Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(29):10726-10731.
- Couvreux P, Kante B, Lenaerts V, Scailteur V, Roland M & Speiser P (1980) Tissue Distribution of Anti-Tumor Drugs Associated with Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles. *J Pharm Sci-U* 69(2):199-202.
- Coyne CB, Shen L, Turner JR & Bergelson JM (2007) Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell host & microbe* 2(3):181-192.
- Crotts G & Park TG (1998) Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. *Journal of microencapsulation* 15(6):699-713.
- Cucullo L, Aumayr B, Rapp E & Janigro D (2005) Drug delivery and in vitro models of the blood-brain barrier. *Current opinion in drug discovery & development* 8(1):89-99.
- Dang TN, Arseneault M, Zarkovic N, Waeg G & Ramassamy C (2010) Molecular regulations induced by acrolein in neuroblastoma SK-N-SH cells: relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 21(4):1197-1216.
- Davies P & Maloney AJ (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2(8000):1403.
- Decuzzi P & Ferrari M (2007) The role of specific and non-specific interactions in receptor-mediated endocytosis of nanoparticles. *Biomaterials* 28(18):2915-2922.

- Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A, Torpier G & Cecchelli R (1997a) A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology* 138(4):877-889.
- Dehouck MP, Vigne P, Torpier G, Breittmayer JP, Cecchelli R & Frelin C (1997b) Endothelin-1 as a mediator of endothelial cell-pericyte interactions in bovine brain capillaries. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17(4):464-469.
- Demeule M, Currie JC, Bertrand Y, Che C, Nguyen T, Regina A, Gabathuler R, Castaigne JP & Beliveau R (2008) Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *Journal of neurochemistry* 106(4):1534-1544.
- Di L, Kerns EH, Bezar IF, Petusky SL & Huang Y (2009) Comparison of blood-brain barrier permeability assays: in situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *Journal of pharmaceutical sciences* 98(6):1980-1991.
- Dickson RB, Willingham MC & Pastan IH (1982) Receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin: inhibition by ionophores and stimulation by Na⁺ and HCO₃⁻. *Annals of the New York Academy of Sciences* 401:38-49.
- Dikalov SI, Vitek MP & Mason RP (2004) Cupric-amyloid beta peptide complex stimulates oxidation of ascorbate and generation of hydroxyl radical. *Free radical biology & medicine* 36(3):340-347.
- Doggui S, Belkacemi A, Paka GD, Perrotte M, Pi R & Ramassamy C (2013) Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways. *Molecular nutrition & food research* 57(9):1660-1670.
- Doggui S, Sahni JK, Arseneault M, Dao L & Ramassamy C (2012) Neuronal uptake and neuroprotective effect of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the human SK-N-SH cell line. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 30(2):377-392.
- Doherty GJ & McMahon HT (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry* 78:857-902.
- Dombu CY, Kroubi M, Zibouche R, Matran R & Betbeder D (2010) Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. *Nanotechnology* 21(35).
- Donaldson JG, Porat-Shliom N & Cohen LA (2009) Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cellular signalling* 21(1):1-6.
- dos Santos T, Varela J, Lynch I, Salvati A & Dawson KA (2011) Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines. *PloS one* 6(9):e24438.
- Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology* 62(6):649-671.
- El-Sayed A & Harashima H (2013) Endocytosis of Gene Delivery Vectors: From Clathrin-dependent to Lipid Raft-mediated Endocytosis. *Molecular Therapy* 21(6):1118-1130.

- Emir UE, Raatz S, McPherson S, Hodges JS, Torkelson C, Tawfik P, White T & Terpstra M (2011) Noninvasive quantification of ascorbate and glutathione concentration in the elderly human brain. *NMR in biomedicine* 24(7):888-894.
- 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 & Alzheimer's Disease I (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366(9503):2112-2117.
- Fischer MJ (2010) Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. *Methods in molecular biology* 627:55-73.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M & Wilcock GK (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Ps* 66(2):137-147.
- Gabbita SP, Lovell MA & Markesbery WR (1998) Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 71(5):2034-2040.
- Gagliardi M, Bardi G & Bifone A (2012) Polymeric nanocarriers for controlled and enhanced delivery of therapeutic agents to the CNS. *Therapeutic delivery* 3(7):875-887.
- Gaillard PJ, Appeldoorn CC, Dorland R, van Kregten J, Manca F, Vugts DJ, Windhorst B, van Dongen GA, de Vries HE, Maussang D & van Tellingen O (2014) Pharmacokinetics, brain delivery, and efficacy in brain tumor-bearing mice of glutathione pegylated liposomal doxorubicin (2B3-101). *PLoS one* 9(1):e82331.
- Gaillard PJ, Appeldoorn CC, Rip J, Dorland R, van der Pol SM, Kooij G, de Vries HE & Reijerkerk A (2012) Enhanced brain delivery of liposomal methylprednisolone improved therapeutic efficacy in a model of neuroinflammation. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 164(3):364-369.
- Gao H (2016) Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery. *Acta pharmaceutica Sinica. B* 6(4):268-286.
- Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Kim HR, Le Doan T, Desmaele D, d'Angelo J, Taran F, Georgin D & Couvreur P (2005a) A methodology to study intracellular distribution of nanoparticles in brain endothelial cells. *International journal of pharmaceutics* 298(2):310-314.
- Garcia-Garcia E, Gil S, Andrieux K, Desmaele D, Nicolas V, Taran F, Georgin D, Andrieux JP, Roux F & Couvreur P (2005b) A relevant in vitro rat model for the evaluation of blood-brain barrier translocation of nanoparticles. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62(12):1400-1408.
- Garcia JT, Farina JB, Munguia O & Llabres M (1999) Comparative degradation study of biodegradable microspheres of poly(DL-lactide-co-glycolide) with poly(ethylene glycol) derivatives. *Journal of microencapsulation* 16(1):83-94.
- Geldenhuys W, Mbimba T, Bui T, Harrison K & Sutariya V (2011) Brain-targeted delivery of paclitaxel using glutathione-coated nanoparticles for brain cancers. *Journal of drug targeting* 19(9):837-845.
- Geldenhuys W, Wehrung D, Groshev A, Hirani A & Sutariya V (2014) Brain-targeted delivery of doxorubicin using glutathione-coated nanoparticles for brain cancers. *Pharmaceutical development and technology* (0):1-10.

- Geldenhuys W, Wehrung D, Groshev A, Hirani A & Sutariya V (2015) Brain-targeted delivery of doxorubicin using glutathione-coated nanoparticles for brain cancers. *Pharmaceutical development and technology* 20(4):497-506.
- Gessner A, Olbrich C, Schroder W, Kayser O & Muller RH (2001) The role of plasma proteins in brain targeting: species dependent protein adsorption patterns on brain-specific lipid drug conjugate (LDC) nanoparticles. *International journal of pharmaceutics* 214(1-2):87-91.
- Gonzalez-Reyes S, Guzman-Beltran S, Medina-Campos ON & Pedraza-Chaverri J (2013) Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013:801418.
- Grabrucker AM, Garner CC, Boeckers TM, Bondioli L, Ruozi B, Forni F, Vandelli MA & Tosi G (2011) Development of Novel Zn²⁺ Loaded Nanoparticles Designed for Cell-Type Targeted Drug Release in CNS Neurons: In Vitro Evidences. *PloS one* 6(3).
- Gref R, Couvreur P, Barratt G & Mysiakine E (2003) Surface-engineered nanoparticles for multiple ligand coupling. *Biomaterials* 24(24):4529-4537.
- Gref R, Luck M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, Blunk T & Muller RH (2000) '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* 18(3-4):301-313.
- Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V & Langer R (1994) Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263(5153):1600-1603.
- Gref R, Quellec P, Sanchez A, Calvo P, Dellacherie E & Alonso MJ (2001) Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 51(2):111-118.
- Grimmer S, van Deurs B & Sandvig K (2002) Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *Journal of cell science* 115(Pt 14):2953-2962.
- Grover A, Hirani A, Pathak Y & Sutariya V (2014) Brain-targeted delivery of docetaxel by glutathione-coated nanoparticles for brain cancer. *AAPS PharmSciTech* 15(6):1562-1568.
- Halliwell B (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research* 31(4):261-272.
- Hans M & Lowman A (2002) Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 6(4):319-327.
- Hansen SH, Sandvig K & van Deurs B (1993) Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *The Journal of cell biology* 121(1):61-72.
- 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. *Pharmaceutical research* 23(1):184-195.

- Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S & Altschuler Y (2007) Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 353(1):26-32.
- Harush-Frenkel O, Rozentur E, Benita S & Altschuler Y (2008) Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules* 9(2):435-443.
- Hillaireau H & Couvreur P (2009) Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66(17):2873-2896.
- Hoheisel D, Nitz T, Franke H, Wegener J, Hakvoort A, Tilling T & Galla HJ (1998) Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system. *Biochemical and biophysical research communications* 244(1):312-316.
- Holtman L, van Vliet EA, Appeldoorn C, Gaillard PJ, de Boer M, Dorland R, Wadman WJ & Gorter JA (2014) Glutathione pegylated liposomal methylprednisolone administration after the early phase of status epilepticus did not modify epileptogenesis in the rat. *Epilepsy research* 108(3):396-404.
- Horwitz SB, Chia GH, Harracksingh C, Orlov S, Pifko-Hirst S, Schneck J, Sorbara L, Speaker M, Wilk EW & Rosen OM (1981) Trifluoperazine inhibits phagocytosis in a macrophagelike cultured cell line. *The Journal of cell biology* 91(3 Pt 1):798-802.
- Hu K, Shi Y, Jiang W, Han J, Huang S & Jiang X (2011) Lactoferrin conjugated PEG-PLGA nanoparticles for brain delivery: preparation, characterization and efficacy in Parkinson's disease. *International journal of pharmaceutics* 415(1-2):273-283.
- Huang HC, Tang D, Xu K & Jiang ZF (2014) 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* 34(1):26-37.
- Innerarity TL & Mahley RW (1978) Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry* 17(8):1440-1447.
- Iversen TG, Skotland T & Sandvig K (2011) Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today* 6(2):176-185.
- Jain A, Chasoo G, Singh SK, Saxena AK & Jain SK (2011) Transferrin-appended PEGylated nanoparticles for temozolomide delivery to brain: in vitro characterisation. *Journal of microencapsulation* 28(1):21-28.
- Jain A & Jain SK (2015) Ligand-Appended BBB-Targeted Nanocarriers (LABTNs). *Crit Rev Ther Drug* 32(2):149-180.
- Jain RA (2000) The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) devices. *Biomaterials* 21(23):2475-2490.
- Joshi SA, Chavhan SS & Sawant KK (2010) Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: preparation, optimization, characterization, in vitro and pharmacodynamic studies. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 76(2):189-199.

- Jubeli E, Moine L, Nicolas V & Barratt G (2012) Preparation of E-selectin-targeting nanoparticles and preliminary in vitro evaluation. *International journal of pharmaceutics* 426(1-2):291-301.
- Kabanov AV & Batrakova EV (2004) New technologies for drug delivery across the blood brain barrier. *Current pharmaceutical design* 10(12):1355-1363.
- Kargul J, Irminger-Finger I & Laurent GJ (2016) Nanomedicine: Application of nanoparticles in clinical therapies and diagnostics. *The international journal of biochemistry & cell biology* 75:140.
- Karmani L, Labar D, Valembois V, Bouchat V, Nagaswaran PG, Bol A, Gillart J, Leveque P, Bouzin C, Bonifazi D, Michiels C, Feron O, Gregoire V, Lucas S, Vander Borght T & Gallez B (2013) Antibody-functionalized nanoparticles for imaging cancer: influence of conjugation to gold nanoparticles on the biodistribution of 89Zr-labeled cetuximab in mice. *Contrast media & molecular imaging* 8(5):402-408.
- Kaur K, Kumar R & Mehta SK (2015) Nanoemulsion: A new medium to study the interactions and stability of curcumin with bovine serum albumin. *J Mol Liq* 209:62-70.
- Kerklaan BM, van Tellingen O, Huitema ADR, Beijnen JH, Boogerd W, Schellens JHM & Brandsma D (2016) Strategies to target drugs to gliomas and CNS metastases of solid tumors. *J Neurol* 263(3):428-440.
- Khalil NM, do Nascimento TC, Casa DM, Dalmolin LF, de Mattos AC, Hoss I, Romano MA & Mainardes RM (2013) Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 101:353-360.
- Kim C, Galloway JF, Lee KH & Searson PC (2014) Universal antibody conjugation to nanoparticles using the Fcγ receptor I (FcγRI): quantitative profiling of membrane biomarkers. *Bioconjugate chemistry* 25(10):1893-1901.
- Kim H, Park BS, Lee KG, Choi CY, Jang SS, Kim YH & Lee SE (2005) Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(22):8537-8541.
- Kim HR, Gil S, Andrieux K, Nicolas V, Appel M, Chacun H, Desmaele D, Taran F, Georgin D & Couvreur P (2007) Low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis of PEGylated nanoparticles in rat brain endothelial cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64(3):356-364.
- Kimura Y, Shirotani K, Yamane H & Kitao T (1988) 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* 21(11):3338-3340.
- Kiss AL & Botos E (2009) Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation ? *Journal of cellular and molecular medicine* 13(7):1228-1237.
- Kovalevich J & Langford D (2013) Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol Biol.* 1078:9-21.(doi):10.1007/1978-1001-62703-62640-62705_62702.

- Krzywkowski P, Ghribi O, Gagne J, Chabot C, Kar S, Rochford J, Massicotte G & Poirier J (1999) Cholinergic systems and long-term potentiation in memory-impaired apolipoprotein E-deficient mice. *Neuroscience* 92(4):1273-1286.
- Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P & Manjunath N (2007) Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448(7149):39-43.
- Kuo YC & Chao IW (2016) Conjugation of melanotransferrin antibody on solid lipid nanoparticles for mediating brain cancer malignancy. *Biotechnology progress* 32(2):480-490.
- Kuratomi Y, Akiyama S, Ono M, Shiraishi N, Shimada T, Ohkuma S & Kuwano M (1986) Thioridazine enhances lysosomal accumulation of epidermal growth factor and toxicity of conjugates of epidermal growth factor with Pseudomonas exotoxin. *Experimental cell research* 162(2):436-448.
- Kwon H-Y, Lee J-Y, Choi S-W, Jang Y & Kim J-H (2001) Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 182(1–3):123-130.
- Lacombe O, Videau O, Chevillon D, Guyot AC, Contreras C, Blondel S, Nicolas L, Ghetas A, Benech H, Thevenot E, Pruvost A, Bolze S, Krzaczkowski L, Prevost C & Mabondzo A (2011) In vitro primary human and animal cell-based blood-brain barrier models as a screening tool in drug discovery. *Molecular pharmaceutics* 8(3):651-663.
- Lai SK, Hida K, Chen C & Hanes J (2008) Characterization of the intracellular dynamics of a non-degradative pathway accessed by polymer nanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 125(2):107-111.
- Lai SK, Hida K, Man ST, Chen C, Machamer C, Schroer TA & Hanes J (2007) Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway. *Biomaterials* 28(18):2876-2884.
- Lauzon MA, Daviau A, Marcos B & Faucheux N (2015) Nanoparticle-mediated growth factor delivery systems: A new way to treat Alzheimer's disease. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 206:187-205.
- Le Bars PL, Katz MM, Berman N, Itil TM, Freedman AM & Schatzberg AF (1997) A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. North American EGb Study Group. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 278(16):1327-1332.
- Lee DH, Rotger C, Appeldoorn CC, Reijerkerk A, Gladdines W, Gaillard PJ & Linker RA (2014) Glutathione PEGylated liposomal methylprednisolone (2B3-201) attenuates CNS inflammation and degeneration in murine myelin oligodendrocyte glycoprotein induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 274(1-2):96-101.
- Li J, Feng L, Fan L, Zha Y, Guo L, Zhang Q, Chen J, Pang Z, Wang Y, Jiang X, Yang VC & Wen L (2011) Targeting the brain with PEG-PLGA nanoparticles modified with phage-displayed peptides. *Biomaterials* 32(21):4943-4950.
- Li XL (2012) Size and shape effects on receptor-mediated endocytosis of nanoparticles. *J Appl Phys* 111(2).

- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(21):8370-8377.
- Lindqvist A, Friden M & Hammarlund-Udenaes M (2016a) Pharmacokinetic considerations of nanodelivery to the brain: Using modeling and simulations to predict the outcome of liposomal formulations. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 92:173-182.
- Lindqvist A, Rip J, Gaillard PJ, Bjorkman S & Hammarlund-Udenaes M (2013) Enhanced brain delivery of the opioid peptide DAMGO in glutathione pegylated liposomes: a microdialysis study. *Molecular pharmaceutics* 10(5):1533-1541.
- Lindqvist A, Rip J, van Kregten J, Gaillard PJ & Hammarlund-Udenaes M (2016b) In vivo Functional Evaluation of Increased Brain Delivery of the Opioid Peptide DAMGO by Glutathione-PEGylated Liposomes. *Pharmaceutical research* 33(1):177-185.
- Liu XF, Miller AL, Yaszemski MJ & Lu LC (2015) Biodegradable and crosslinkable PPF-PLGA-PEG self-assembled nanoparticles dual-decorated with folic acid ligands and Rhodamine B fluorescent probes for targeted cancer imaging. *Rsc Adv* 5(42):33275-33282.
- Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA & Allen DD (2002) Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug development and industrial pharmacy* 28(1):1-13.
- Lockman PR, Oyewumi MO, Koziara JM, Roder KE, Mumper RJ & Allen DD (2003) Brain uptake of thiamine-coated nanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 93(3):271-282.
- Loerke D, Mettlen M, Yarar D, Jaqaman K, Jaqaman H, Danuser G & Schmid SL (2009) Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *PLoS biology* 7(3):e57.
- Lu JH, Guo J & Yang WH (2006) [Effects of green tea polyphenol on the behaviour of Alzheimer's disease like mice induced by D-galactose and Aβ₂₅₋₃₅]. *Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials* 29(4):352-354.
- Lu T, Aron L, Zullo J, Pan Y, Kim H, Chen YW, Yang TH, Kim HM, Drake D, Liu XS, Bennett DA, Colaiacovo MP & Yankner BA (2014) REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature* 507(7493):448-+.
- Lu T, Sun J, Chen X, Zhang P & Jing X (2009) Folate-conjugated micelles and their folate-receptor-mediated endocytosis. *Macromol Biosci* 9(11):1059-1068.
- Lu Y & Low PS (2002a) Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Advanced drug delivery reviews* 54(5):675-693.
- Lu Y & Low PS (2002b) Folate targeting of haptens to cancer cell surfaces mediates immunotherapy of syngeneic murine tumors. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 51(3):153-162.
- Lucarelli M, Borrelli V, Fiori A, Cucina A, Granata F, Potenza RL, Scarpa S, Cavallaro A & Strom R (2002) The expression of native and oxidized LDL receptors in brain microvessels is specifically enhanced by astrocytes-derived soluble factor(s). *Febs Lett* 522(1-3):19-23.

- Luo J & Shi R (2005) Acrolein induces oxidative stress in brain mitochondria. *Neurochemistry international* 46(3):243-252.
- Ma QL, Zuo X, Yang F, Ubeda OJ, Gant DJ, Alaverdyan M, Teng E, Hu S, Chen PP, Maiti P, Teter B, Cole GM & Frautschy SA (2013) Curcumin suppresses soluble tau dimers and corrects molecular chaperone, synaptic, and behavioral deficits in aged human tau transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 288(6):4056-4065.
- Mahmood DF, Abderrazak A, El Hadri K, Simmet T & Rouis M (2013) The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling* 19(11):1266-1303.
- Makadia HK & Siegel SJ (2011) Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* 3(3):1377-1397.
- Malakoutikhah M, Guixer B, Arranz-Gibert P, Teixido M & Giralt E (2014) 'A la carte' peptide shuttles: tools to increase their passage across the blood-brain barrier. *ChemMedChem* 9(7):1594-1601.
- Malakoutikhah M, Prades R, Teixido M & Giralt E (2010) N-methyl phenylalanine-rich peptides as highly versatile blood-brain barrier shuttles. *Journal of medicinal chemistry* 53(6):2354-2363.
- Malakoutikhah M, Teixido M & Giralt E (2008) Toward an optimal blood-brain barrier shuttle by synthesis and evaluation of peptide libraries. *Journal of medicinal chemistry* 51(16):4881-4889.
- Malcor JD, Payrot N, David M, Faucon A, Abouzid K, Jacquot G, Floquet N, Debarbieux F, Rougon G, Martinez J, Khrestchatisky M, Vlieghe P & Lisowski V (2012) Chemical optimization of new ligands of the low-density lipoprotein receptor as potential vectors for central nervous system targeting. *Journal of medicinal chemistry* 55(5):2227-2241.
- Manoochehri S, Darvishi B, Kamalinia G, Amini M, Fallah M, Ostad SN, Atyabi F & Dinarvand R (2013) Surface modification of PLGA nanoparticles via human serum albumin conjugation for controlled delivery of docetaxel. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences* 21(1):58.
- Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafaci JA & Freedman ML (1998) Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Experimental neurology* 150(1):40-44.
- Mari M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C & Fernandez-Checa JC (2009) Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & redox signaling* 11(11):2685-2700.
- Mathew A, Fukuda T, Nagaoka Y, Hasumura T, Morimoto H, Yoshida Y, Maekawa T, Venugopal K & Kumar DS (2012) Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *PloS one* 7(3):e32616.
- Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430(7000):631-639.
- Mattson MR (2006) Molecular and cellular pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Res Per Alz* Doi 10.1007/978-3-540-37652-1_47:371-375.

- Mayor S & Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(8):603-612.
- Meder F, Thomas SS, Fitzpatrick LW, Alahmari A, Wang SX, Beirne JG, Vaz G, Redmond G & Dawson KA (2016) Labeling the Structural Integrity of Nanoparticles for Advanced In Situ Tracking in Bionanotechnology. *ACS nano* 10(4):4660-4671.
- Medina-Kauwe LK (2007) "Alternative" endocytic mechanisms exploited by pathogens: new avenues for therapeutic delivery? *Advanced drug delivery reviews* 59(8):798-809.
- Mercer J & Helenius A (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320(5875):531-535.
- Minost A, Delaveau J, Bolzinger MA, Fessi H & Elaissari A (2012) Nanoparticles via nanoprecipitation process. *Recent patents on drug delivery & formulation* 6(3):250-258.
- 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. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 150(2):220-228.
- Moghimi SM, Hunter AC & Murray JC (2001) Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacological reviews* 53(2):283-318.
- Montenegro JM, Grazu V, Sukhanova A, Agarwal S, de la Fuente JM, Nabiev I, Greiner A & Parak WJ (2013) Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery. *Advanced drug delivery reviews* 65(5):677-688.
- Mukherjee S, Ghosh RN & Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiological reviews* 77(3):759-803.
- Mulik RS, Monkkonen J, Juvonen RO, Mahadik KR & Paradkar AR (2010a) 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* 7(3):815-825.
- Mulik RS, Monkkonen J, Juvonen RO, Mahadik KR & Paradkar AR (2010b) Transferrin mediated solid lipid nanoparticles containing curcumin: enhanced in vitro anticancer activity by induction of apoptosis. *International journal of pharmaceutics* 398(1-2):190-203.
- Mullan GM, McEneny J, Fuchs M, McMaster C, Todd S, McGuinness B, Henry M, Passmore AP, Young IS & Johnston JA (2013) Plasma clusterin levels and the rs11136000 genotype in individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* 10(9):973-978.
- Muller RH, Jacobs C & Kayser O (2001) Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev* 47(1):3-19.
- Nabi IR (2009) Cavin fever: regulating caveolae. *Nature cell biology* 11(7):789-791.
- Nair LS & Laurencin CT (2007) Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science* 32(8):762-798.

- Nankoe SR & Sever S (2006) Dynasore puts a new spin on dynamin: a surprising dual role during vesicle formation. *Trends in cell biology* 16(12):607-609.
- Ng TP, Chiam PC, Lee T, Chua HC, Lim L & Kua EH (2006) Curry consumption and cognitive function in the elderly. *American journal of epidemiology* 164(9):898-906.
- Ni M, Xiong M, Zhang X, Cai G, Chen H, Zeng Q & Yu Z (2015) Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles conjugated with CD133 aptamers for targeted salinomycin delivery to CD133+ osteosarcoma cancer stem cells. *Int J Nanomedicine* 10:2537-2554.
- Niewoehner J, Bohrmann B, Collin L, Urich E, Sade H, Maier P, Rueger P, Stracke JO, Lau W, Tissot AC, Loetscher H, Ghosh A & Freskgard PO (2014) Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron* 81(1):49-60.
- Nilsson L, Nordberg A, Hardy J, Wester P & Winblad B (1986) Physostigmine restores 3H-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level. *J Neural Transm* 67(3-4):275-285.
- Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N & Kawashima Y (1994) 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. *Journal of pharmaceutical sciences* 83(5):727-732.
- Nordberg A, Lilja A, Lundqvist H, Hartvig P, Amberla K, Viitanen M, Warpman U, Johansson M, Hellstrom-Lindahl E, Bjurling P & et al. (1992) Tacrine restores cholinergic nicotinic receptors and glucose metabolism in Alzheimer patients as visualized by positron emission tomography. *Neurobiology of aging* 13(6):747-758.
- Nordberg A & Svensson AL (1998) Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience* 19(6):465-480.
- Nunan J & Small DH (2000) Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *Febs Lett* 483(1):6-10.
- Oba M, Aoyagi K, Miyata K, Matsumoto Y, Itaka K, Nishiyama N, Yarnasaki Y, Koyama H & Kataoka K (2008) Polyplex Micelles with Cyclic RGD Peptide Ligands and Disulfide Cross-Links Directing to the Enhanced Transfection via Controlled Intracellular Trafficking. *Molecular pharmaceutics* 5(6):1080-1092.
- Oh N & Park JH (2014) Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomed* 9:51-63.
- Oh P, Borgstrom P, Witkiewicz H, Li Y, Borgstrom BJ, Chrastina A, Iwata K, Zinn KR, Baldwin R, Testa JE & Schnitzer JE (2007) Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. *Nature biotechnology* 25(3):327-337.
- Omidi Y, Barar J, Ahmadian S, Heidari HR & Gumbleton M (2008) Characterization and astrocytic modulation of system L transporters in brain microvasculature endothelial cells. *Cell Biochem Funct* 26(3):381-391.
- Ono K, Hasegawa K, Naiki H & Yamada M (2004) Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J Neurosci Res* 75(6):742-750.

- Orth JD, Krueger EW, Weller SG & McNiven MA (2006) A novel endocytic mechanism of epidermal growth factor receptor sequestration and internalization. *Cancer research* 66(7):3603-3610.
- Paka GD, Doggui S, Zaghmi A, Safar R, Dao L, Reisch A, Klymchenko A, Roullin VG, Joubert O & Ramassamy C (2016) Neuronal Uptake and Neuroprotective Properties of Curcumin-Loaded Nanoparticles on SK-N-SH Cell Line: Role of Poly(lactide-co-glycolide) Polymeric Matrix Composition. *Molecular Pharmaceutics* 13(2):391-403.
- Panyam J & Labhasetwar V (2012) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, Supplement(0):61-71.
- Pardridge WM (1999) Vector-mediated drug delivery to the brain. *Advanced drug delivery reviews* 36(2-3):299-321.
- Park SC (2002) Functional recovery of senescent cells through restoration of receptor-mediated endocytosis. *Mechanisms of ageing and development* 123(8):917-926.
- Park SY, Kim HS, Cho EK, Kwon BY, Phark S, Hwang KW & Sul D (2008) Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. *Food Chem Toxicol* 46(8):2881-2887.
- Park TG (1994) Degradation of poly (D, L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. *Journal of Controlled Release* 30(2):161-173.
- Parkar NS, Akpa BS, Nitsche LC, Wedgewood LE, Place AT, Sverdlov MS, Chaga O & Minshall RD (2009) Vesicle formation and endocytosis: function, machinery, mechanisms, and modeling. *Antioxidants & redox signaling* 11(6):1301-1312.
- Parton RG & Simons K (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Bio* 8(3):185-194.
- Parveen S, Misra R & Sahoo SK (2012) Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 8(2):147-166.
- Passirani C, Barratt G, Devissaguet JP & Labarre D (1998) Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate). *Pharmaceutical research* 15(7):1046-1050.
- Patel PJ, Acharya NS & Acharya SR (2013) Development and characterization of glutathione-conjugated albumin nanoparticles for improved brain delivery of hydrophilic fluorescent marker. *Drug Deliv* 20(3-4):143-155.
- Patel PJ & Acharya SR (2012) Design and Development of Glutathione Conjugated Poly (d, l) lactide Nanocarriers for Delivery of Hydrophilic Fluorescent Marker across Blood Brain Barrier. *Curr Nanosci* 8(6):847-857.
- Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH & Tomlinson BE (1977) Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci* 34(2):247-265.
- Pirollo KF & Chang EH (2008) Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake? *Trends in biotechnology* 26(10):552-558.

- Pluta R, Bogucka-Kocka A, Ulamek-Kozioł M, Furmaga-Jablonska W, Januszewski S, Brzozowska J, Jablonski M & Kocki J (2015) Neurogenesis and neuroprotection in postischemic brain neurodegeneration with Alzheimer phenotype: is there a role for curcumin? *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* 53(2):89-99.
- Poirier J, Miron J, Picard C, Gormley P, Theroux L, Breitner J & Dea D (2014) Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 35 Suppl 2:S3-10.
- Prades R, Oller-Salvia B, Schwarzmaier SM, Selva J, Moros M, Balbi M, Grazu V, de La Fuente JM, Egea G, Plesnila N, Teixido M & Giralt E (2015) Applying the retro-enantio approach to obtain a peptide capable of overcoming the blood-brain barrier. *Angew Chem Int Ed Engl* 54(13):3967-3972.
- Qian ZM, Li H, Sun H & Ho K (2002) Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacological reviews* 54(4):561-587.
- Rabanel JM, Aoun V, Elkin I, Mokhtar M & Hildgen P (2012) Drug-loaded nanocarriers: passive targeting and crossing of biological barriers. *Current medicinal chemistry* 19(19):3070-3102.
- Rabanel JM, Faivre J, Paka GD, Ramassamy C, Hildgen P & Banquy X (2015a) Effect of polymer architecture on curcumin encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: Toward a drug delivery nanoplatform to the CNS. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 96:409-420.
- Rabanel JM, Faivre J, Tehrani SF, Lalloz A, Hildgen P & Banquy X (2015b) Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles. *Acs Applied Materials & Interfaces* 7(19):10374-10385.
- Rabanel JM, Hildgen P & Banquy X (2014) Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *Journal of Controlled Release* 185:71-87.
- Ramassamy C (2006) Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol* 545(1):51-64.
- Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Bastianetto S, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Davignon J, Quirion R & Poirier J (1999) Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free radical biology & medicine* 27(5-6):544-553.
- Ramassamy C, Krzywkowski P, Averill D, Lussier-Cacan S, Theroux L, Christen Y, Davignon J & Poirier J (2001) Impact of apoE deficiency on oxidative insults and antioxidant levels in the brain. *Mol Brain Res* 86(1-2):76-83.
- Ramchandani M & Robinson D (1998) In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 54(2):167-175.
- Rapoport SI (1996) Modulation of blood-brain barrier permeability. *Journal of drug targeting* 3(6):417-425.

- Raval N, Mistry T, Acharya N & Acharya S (2015) Development of glutathione-conjugated asiatic acid-loaded bovine serum albumin nanoparticles for brain-targeted drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 67(11):1503-1511.
- Ravenelle F, Vachon P, Rigby-Jones AE, Sneyd JR, Le Garrec D, Gori S, Lessard D & Smith DC (2008) Anaesthetic effects of propofol polymeric micelle: a novel water soluble propofol formulation. *British journal of anaesthesia* 101(2):186-193.
- Reitz C, Brayne C & Mayeux R (2011) Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 7(3):137-152.
- Rezaeiipoor R, John R, Adie SG, Chaney EJ, Marjanovic M, Oldenburg AL, Rinne SA & Boppart SA (2009) Fc-DIRECTED ANTIBODY CONJUGATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES FOR ENHANCED MOLECULAR TARGETING. *Journal of innovative optical health sciences* 2(4):387-396.
- Rigaux G, Roullin VG, Cadiou C, Portefaix C, Van Gulick L, Boeuf G, Andry MC, Hoeffel C, Vander Elst L, Laurent S, Muller R, Molinari M & Chuburu F (2014) A new magnetic resonance imaging contrast agent loaded into poly(lacide-co-glycolide) nanoparticles for long-term detection of tumors. *Nanotechnology* 25(44):445103.
- Rijnbouts S, Jansen G, Posthuma G, Hynes JB, Schornagel JH & Strous GJ (1996) Endocytosis of GPI-linked membrane folate receptor-alpha. *The Journal of cell biology* 132(1-2):35-47.
- 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(2):85-92.
- Rip J, Chen LD, Hartman R, van den Heuvel A, Reijerkerk A, van Kregten J, van der Boom B, Appeldoorn C, de Boer M, Maussang D, de Lange ECM & Gaillard PJ (2014) Glutathione PEGylated liposomes: pharmacokinetics and delivery of cargo across the blood-brain barrier in rats. *Journal of drug targeting* 22(5):460-467.
- Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B & Sandvig K (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Molecular biology of the cell* 10(4):961-974.
- Roney C, Kulkarni P, Arora V, Antich P, Bonte F, Wu A, Mallikarjuana NN, Manohar S, Liang HF, Kulkarni AR, Sung HW, Sairam M & Aminabhavi TM (2005) Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 108(2-3):193-214.
- Rotman M, Welling MM, Bunschoten A, de Backer ME, Rip J, Nabuurs RJ, Gaillard PJ, van Buchem MA, van der Maarel SM & van der Weerd L (2015) Enhanced glutathione PEGylated liposomal brain delivery of an anti-amyloid single domain antibody fragment in a mouse model for Alzheimer's disease. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 203:40-50.
- Sahay G, Alakhova DY & Kabanov AV (2010a) Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 145(3):182-195.

- Sahay G, Kim JO, Kabanov AV & Bronich TK (2010b) The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents. *Biomaterials* 31(5):923-933.
- Sahni JK, Doggui S, Ali J, Baboota S, Dao L & Ramassamy C (2011) Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 152(2):208-231.
- 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 biomaterialia* 4(6):1752-1761.
- Salisbury JL, Condeelis JS & Satir P (1980) Role of coated vesicles, microfilaments, and calmodulin in receptor-mediated endocytosis by cultured B lymphoblastoid cells. *The Journal of cell biology* 87(1):132-141.
- Salvati A, Pitek AS, Monopoli MP, Prapainop K, Bombelli FB, Hristov DR, Kelly PM, Aberg C, Mahon E & Dawson KA (2013) Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature nanotechnology* 8(2):137-143.
- Scalbert A & Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130(8S Suppl):2073S-2085S.
- Schaffler M, Sousa F, Wenk A, Sitia L, Hirn S, Schleh C, Haberl N, Violatto M, Canovi M, Andreozzi P, Salmona M, Bigini P, Kreyling WG & Krol S (2014) Blood protein coating of gold nanoparticles as potential tool for organ targeting. *Biomaterials* 35(10):3455-3466.
- Schnitzer JE, Liu J & Oh P (1995) Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *The Journal of biological chemistry* 270(24):14399-14404.
- Schroeder U, Sommerfeld P, Ulrich S & Sabel BA (1998) Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *J Pharm Sci-U.S.* 87(11):1305-1307.
- Schulze H, Kolter T & Sandhoff K (2009) Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochimica et biophysica acta* 1793(4):674-683.
- Schutz CA, Juillerat-Jeanneret L, Mueller H, Lynch I & Riediker M (2013) Therapeutic nanoparticles in clinics and under clinical evaluation. *Nanomedicine (Lond)* 8(3):449-467.
- Segura-Sanchez F, Montembault V, Fontaine L, Martinez-Barbosa ME, Bouchemal K & Ponchel G (2010) Synthesis and characterization of functionalized poly(gamma-benzyl-L-glutamate) derivatives and corresponding nanoparticles preparation and characterization. *International journal of pharmaceutics* 387(1-2):244-252.
- Seitz DP, Gruneir A, Conn DK & Rochon PA (2009) Cholinesterase inhibitor use in U.S. nursing homes: results from the national nursing home survey. *J Am Geriatr Soc* 57(12):2269-2274.
- Shive MS & Anderson JM (1997) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 28(1):5-24.

- Sies H (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free radical biology & medicine* 27(9-10):916-921.
- Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S & Di Fiore PP (2008) Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Developmental cell* 15(2):209-219.
- Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V & Ramassamy C (2008) Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J Agric Food Chem* 56(13):4855-4873.
- Singh M, Dang TN, Arseneault M & Ramassamy C (2010) Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 21(3):741-756.
- Skotland T, Iversen TG & Sandvig K (2014) Development of nanoparticles for clinical use. *Nanomedicine (Lond)* 9(9):1295-1299.
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR & Rudzinski WE (2001) Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 70(1-2):1-20.
- Sousa AA, Hassan SA, Knittel LL, Balbo A, Aronova MA, Brown PH, Schuck P & Leapman RD (2016) Biointeractions of ultrasmall glutathione-coated gold nanoparticles: effect of small size variations. *Nanoscale* 8(12):6577-6588.
- Sousa AA, Morgan JT, Brown PH, Adams A, Jayasekara MP, Zhang G, Ackerson CJ, Kruhlak MJ & Leapman RD (2012) Synthesis, characterization, and direct intracellular imaging of ultrasmall and uniform glutathione-coated gold nanoparticles. *Small* 8(14):2277-2286.
- Sousa F, Mandal S, Garrovo C, Astolfo A, Bonifacio A, Latawiec D, Menk RH, Arfelli F, Huewel S, Legname G, Galla HJ & Krol S (2010) Functionalized gold nanoparticles: a detailed in vivo multimodal microscopic brain distribution study. *Nanoscale* 2(12):2826-2834.
- Stella B, Marsaud V, Arpicco S, Geraud G, Cattel L, Couvreur P & Renoir JM (2007) Biological characterization of folic acid-conjugated poly(H2NPEGCA-co-HDCA) nanoparticles in cellular models. *Journal of drug targeting* 15(2):146-153.
- Stolnik S, Garnett MC, Davies MC, Illum L, Bousta M, Vert M & Davis SS (1995) The colloidal properties of surfactant-free biodegradable nanospheres from poly(β -malic acid-co-benzyl malate)s and poly(lactic acid-co-glycolide). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 97(3):235-245.
- Strazielle N & Ghersi-Egea JF (2005) Factors affecting delivery of antiviral drugs to the brain. *Reviews in medical virology* 15(2):105-133.
- Su G, Zhou X, Zhou H, Li Y, Zhang X, Liu Y, Cao D & Yan B (2016) Size-Dependent Facilitation of Cancer Cell Targeting by Proteins Adsorbed on Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces* 8(44):30037-30047.
- Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH & McGraw TE (1999) Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(12):6775-6780.

- Sultana R & Butterfield DA (2004) Oxidatively modified GST and MRP1 in Alzheimer's disease brain: Implications for accumulation of reactive lipid peroxidation products. *Neurochem Res* 29(12):2215-2220.
- Sultana R, Perluigi M & Butterfield DA (2009) Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Abeta in pathogenesis. *Acta neuropathologica* 118(1):131-150.
- Sun W, Xie C, Wang H & Hu Y (2004) Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. *Biomaterials* 25(15):3065-3071.
- Tabaton M & Tamagno E (2007) The molecular link between beta- and gamma-secretase activity on the amyloid beta precursor protein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64(17):2211-2218.
- Tada H, Higuchi H, Wanatabe TM & Ohuchi N (2007) In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer research* 67(3):1138-1144.
- Taghdisi SM, Danesh NM, Lavaee P, Emrani AS, Hassanabad KY, Ramezani M & Abnous K (2016) Double targeting, controlled release and reversible delivery of daunorubicin to cancer cells by polyvalent aptamers-modified gold nanoparticles. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 61:753-761.
- Taylor EM (2002) The impact of efflux transporters in the brain on the development of drugs for CNS disorders. *Clinical pharmacokinetics* 41(2):81-92.
- Teixido M, Zurita E, Malakoutikhah M, Tarrago T & Giralt E (2007) Diketopiperazines as a tool for the study of transport across the blood-brain barrier (BBB) and their potential use as BBB-shuttles. *J Am Chem Soc* 129(38):11802-11813.
- Tillement L, Lecanu L & Papadopoulos V (2011) Alzheimer's disease: effects of beta-amyloid on mitochondria. *Mitochondrion* 11(1):13-21.
- Tiwari SK, Agarwal S, Seth B, Yadav A, Nair S, Bhatnagar P, Karmakar M, Kumari M, Chauhan LKS, Patel DK, Srivastava V, Singh D, Gupta SK, Tripathi A, Chaturvedi RK & Gupta KC (2014) Curcumin-Loaded Nanoparticles Potently Induce Adult Neurogenesis and Reverse Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Model via Canonical Wnt/beta-Catenin Pathway. *ACS nano* 8(1):76-103.
- Torchilin VP (2006a) Multifunctional nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews* 58(14):1532-1555.
- Torchilin VP (2006b) Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev Biomed Eng* 8:343-375.
- Torchilin VP, Omelyanenko VG, Papisov MI, Bogdanov AA, Jr., Trubetskoy VS, Herron JN & Gentry CA (1994) Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochimica et biophysica acta* 1195(1):11-20.
- Trofymchuk K, Reisch A, Shulov I, Mely Y & Klymchenko AS (2014) Tuning the color and photostability of perylene diimides inside polymer nanoparticles: towards biodegradable substitutes of quantum dots. *Nanoscale* 6(21):12934-12942.

- Trougakos IP & Gonos ES (2006) Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. *Free radical research* 40(12):1324-1334.
- Tsai Y-M, Chien C-F, Lin L-C & Tsai T-H (2011) Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood–brain barrier penetration. *International journal of pharmaceutics* 416(1):331-338.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M & Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(1):44-84.
- van der Meel R, Vehmeijer LJ, Kok RJ, Storm G & van Gaal EV (2013) Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status. *Advanced drug delivery reviews* 65(10):1284-1298.
- Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN & Braeckmans K (2010) The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls. *Molecular Therapy* 18(3):561-569.
- Vinters HV, Miller BL & Pardridge WM (1988) Brain amyloid and Alzheimer disease. *Annals of internal medicine* 109(1):41-54.
- Vogelgesang S, Warzok RW, Cascorbi I, Kunert-Keil C, Schroeder E, Kroemer HK, Siegmund W, Walker LC & Pahnke J (2004) The role of P-glycoprotein in cerebral amyloid angiopathy; implications for the early pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* 1(2):121-125.
- Waiczies S, Lepore S, Sydow K, Drechsler S, Ku MC, Martin C, Lorenz D, Schutz I, Reimann HM, Purfurst B, Dieringer MA, Waiczies H, Dathe M, Pohlmann A & Niendorf T (2015) Anchoring dipalmitoyl phosphoethanolamine to nanoparticles boosts cellular uptake and fluorine-19 magnetic resonance signal. *Scientific reports* 5:8427.
- Wang D, El-Amouri SS, Dai M, Kuan CY, Hui DY, Brady RO & Pan D (2013a) Engineering a lysosomal enzyme with a derivative of receptor-binding domain of apoE enables delivery across the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(8):2999-3004.
- Wang JX, Sun X & Zhang ZR (2002) Enhanced brain targeting by synthesis of 3',5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 54(3):285-290.
- Wang L, Hao Y, Li H, Zhao Y, Meng D, Li D, Shi J, Zhang H, Zhang Z & Zhang Y (2015) Co-delivery of doxorubicin and siRNA for glioma therapy by a brain targeting system: angiopep-2-modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Journal of drug targeting* 23(9):832-846.
- Wang N & Wu XS (1997) Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid oligomers: Part II. Biodegradation and drug delivery application. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 9(1):75-87.
- Wang T, Kievit FM, Veiseh O, Arami H, Stephen ZR, Fang C, Liu Y, Ellenbogen RG & Zhang M (2013b) Targeted cell uptake of a noninternalizing antibody through conjugation to iron

- oxide nanoparticles in primary central nervous system lymphoma. *World neurosurgery* 80(1-2):134-141.
- Wattiaux R, Laurent N, Wattiaux-De Coninck S & Jadot M (2000) Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Advanced drug delivery reviews* 41(2):201-208.
- Weissmann G (1967) The role of lysosomes in inflammation and disease. *Annual review of medicine* 18(1):97-112.
- Wils P, Phung-Ba V, Warnery A, Lechardeur D, Raeissi S, Hidalgo IJ & Scherman D (1994) Polarized transport of docetaxel and vinblastine mediated by P-glycoprotein in human intestinal epithelial cell monolayers. *Biochemical pharmacology* 48(7):1528-1530.
- Xu Y, Baiu DC, Sherwood JA, McElreath MR, Qin Y, Lackey KH, Otto M & Bao Y (2014) Linker-free conjugation and specific cell targeting of antibody functionalized iron-oxide nanoparticles. *Journal of materials chemistry. B, Materials for biology and medicine* 2(37):6198-6206.
- Yang CG, Rait A, Pirollo KF, Dagata JA, Farkas N & Chang EH (2008a) Nanoimmunoliposome delivery of superparamagnetic iron oxide markedly enhances targeting and uptake in human cancer cells in vitro and in vivo. *Nanomed-Nanotechnol* 4(4):318-329.
- Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kaye R, Glabe CG, Frautschy SA & Cole GM (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *The Journal of biological chemistry* 280(7):5892-5901.
- Yang J, Lim EK, Lee HJ, Park J, Lee SC, Lee K, Yoon HG, Suh JS, Huh YM & Haam S (2008b) Fluorescent magnetic nanohybrids as multimodal imaging agents for human epithelial cancer detection. *Biomaterials* 29(16):2548-2555.
- Yemisci M, Caban S, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Novoa-Carballal R, Riguera R, Fernandez-Megia E, Andrieux K, Couvreur P, Capan Y & Dalkara T (2015) Systemically administered brain-targeted nanoparticles transport peptides across the blood-brain barrier and provide neuroprotection. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35(3):469-475.
- Yoshiike Y, Tanemura K, Murayama O, Akagi T, Murayama M, Sato S, Sun X, Tanaka N & Takashima A (2001) New insights on how metals disrupt amyloid beta-aggregation and their effects on amyloid-beta cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 276(34):32293-32299.
- Young KD (2006) The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol R* 70(3):660-+.
- Zarabi MF, Farhangi A, Mazdeh SK, Ansarian Z, Zare D, Mehrabi MR & Akbarzadeh A (2014) Synthesis of Gold Nanoparticles Coated with Aspartic Acid and Their Conjugation with FVIII Protein and FVIII Antibody. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* 29(2):154-160.
- Zensi A, Begley D, Pontikis C, Legros C, Mihoreanu L, Wagner S, Buchel C, von Briesen H & Kreuter J (2009) Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 137(1):78-86.

- Zhang C, Wan X, Zheng X, Shao X, Liu Q, Zhang Q & Qian Y (2014) Dual-functional nanoparticles targeting amyloid plaques in the brains of Alzheimer's disease mice. *Biomaterials* 35(1):456-465.
- Zhang S, Gao H & Bao G (2015) Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS nano* 9(9):8655-8671.
- Zhang SL, Li J, Lykotrafitis G, Bao G & Suresh S (2009) Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv Mater* 21(4):419-+.
- Zhang XQ, Xu X, Bertrand N, Pridgen E, Swami A & Farokhzad OC (2012) Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine. *Advanced drug delivery reviews* 64(13):1363-1384.
- Zong T, Mei L, Gao H, Cai W, Zhu P, Shi K, Chen J, Wang Y, Gao F & He Q (2014) Synergistic dual-ligand doxorubicin liposomes improve targeting and therapeutic efficacy of brain glioma in animals. *Molecular pharmaceutics* 11(7):2346-2357.