



Administration par voie intranasale d'un principe actif hydrophile d'intérêt thérapeutique potentiel pour le traitement de la maladie d'Alzheimer

Thomas Adnet

► To cite this version:

Thomas Adnet. Administration par voie intranasale d'un principe actif hydrophile d'intérêt thérapeutique potentiel pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02433553

HAL Id: dumas-02433553

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02433553>

Submitted on 9 Jan 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

Préparé au sein de l'Université de Caen Normandie

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie

Administration par voie intranasale d'un principe actif hydrophile d'intérêt thérapeutique potentiel pour le traitement de la maladie d'Alzheimer

**Présenté par
Thomas ADNET**

**Soutenu publiquement le 07 mai 2019
devant le jury composé de**

Mme Aurélie MALZER FREON	Professeur en Pharmacie Galénique, CERMN, EA 4258, Faculté des Sciences pharmaceutiques, Caen	Président du jury
Mme Anne Claire GROO	Maitre de Conférences en Pharmacie Galénique, CERMN, EA 4258, Faculté des Sciences pharmaceutiques, Caen	Examineur
M. Frederic BOUNOURE	Maitre de Conférence en Pharmacie Galénique (SMS EA3233), UFR Santé Rouen, Praticien Hospitalier au CH d'Yvetot	Examineur
Mme Charlotte GOURIO	Docteur en pharmacie, Praticien hospitalier CHU de Caen	Examineur
Mme Sophie FEDRIZZI	Docteur en pharmacie, Praticien hospitalier CHU de Caen	Examineur

Mémoire dirigé par Aurélie MALZERT FREON et Anne Claire GROO



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques



LISTE DES ENSEIGNANTS – CHERCHEURS

Année Universitaire 2017 / 2018

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques

Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs

Professeur Frédéric FABIS

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD

Directrice administrative et Directrice administrative adjointe

Madame Sarah CHEMTOB

Madame Alexandra HOUARD

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GAUDUCHON Pascal Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Biologie cellulaire
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
RAULT Sylvain Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Chimie thérapeutique
ROCHAIS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale



MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR

Biochimie, Toxicologie

BOUET Valentine – HDR

Physiologie, Pharmacologie

CAILLY Thomas – HDR

Chimie bio-inorganique, Chimie organique

DENOYELLE Christophe – HDR

Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie,
Cancérologie

DHALLUIN Anne

Bactériologie, Virologie, Immunologie

ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR

Parasitologie, Mycologie médicale

GROO Anne-Claire

Pharmacie galénique

KIEFFER Charline

Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier)

Biologie clinique

LAPORTE-WOJCIK Catherine

Chimie bio-inorganique

LEBAILLY Pierre – HDR

Santé publique

LECHEVREL Mathilde – HDR

Toxicologie

LEGER Marianne

Physiologie, Pharmacologie

LEPAILLEUR Alban – HDR

Modélisation moléculaire

N'DIAYE Monique

Parasitologie, Mycologie médicale,
Biochimie clinique

PAIZANIS Eleni

Physiologie, Pharmacologie

PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima

Chimie organique et thérapeutique

POTTIER Ivannah

Chimie et toxicologie analytiques

PREVOST Virginie – HDR

Chimie analytique, Nutrition, Education
thérapeutique du patient

QUINTIN Jérôme

Pharmacognosie

RIOULT Jean-Philippe

Botanique, Mycologie, Biotechnologies

SINCE Marc

Chimie analytique

VILLEDIEU Marie

Biologie et thérapies innovantes des cancers



PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)

PRICOT Sophie

Anglais

PERSONNEL ASSOCIÉ À TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume

Pharmacie clinique

SEGONZAC Alain

Pharmacologie, Essais cliniques

RICHARD Estelle

Pharmacie officinale

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

A mes deux grands-mères Monique et Josiane et à leur arrière-petit-fils Mathis,



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

*« Que l'on me donne six heures pour couper un arbre, j'en passerai quatre à préparer ma hache. »
Abraham Lincoln*

*« La mémoire est souvent la qualité de la sottise. »
François-René de Chateaubriand*



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques



Je tenais à remercier très chaleureusement le Pr Aurélie MALZERT FREON, ma directrice et présidente de thèse, pour son accompagnement et son soutien tout au long de cette aventure depuis Mai 2016 à aujourd'hui. Merci d'avoir pu me donner la chance de participer à ce beau travail et de la confiance que tu as su me porter durant ces nombreux mois passés au labo et ceux qui suivirent pour la réalisation de cette thèse. Merci de m'avoir fait découvrir ce formidable domaine qu'est la recherche et d'avoir su me transmettre nombre de connaissances scientifiques et de méthodes de travail qui sauront, j'en suis certain, être précieuses dans ma vie à venir.

Je tenais à remercier tout autant chaleureusement le Dr Anne Claire GROO, ma co-directrice de thèse, pour son accompagnement et son soutien tout au long de ce travail. Merci pour ton aide et d'avoir su m'apporter tes connaissances éclairées sur des sujets parfois obscurs pour moi.

S'il ne devait rester qu'une seule chose de ce travail, je garderai en mémoire tous ces agréables moments passés avec vous et la jovialité qui vous caractérise si bien.

Alors merci à toute les deux, du fond du cœur.

Je tenais à remercier le Dr Frédéric BOUNOURE d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je tenais à remercier le Dr Charlotte GOURIO d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Je tenais à te remercier aussi de ton soutien et de ton accompagnement pour les travaux récents que j'ai menés durant mon internat. Merci de m'avoir éclairé avec le Dr Catherine CHAPIROT, le Dr Lucie CHEVREMONTE et le Dr Aline GOUSSET, sur ce beau et fascinant domaine qu'est celui des dispositifs médicaux. Cette thèse ne porte pas sur ce sujet, mais qu'importe, ce sont là les deux piliers de mon internat et qui sait, peut-être un jour se réuniront-ils ?

Je tenais à remercier le Dr Sophie FEDRIZZI d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Je tenais à te remercier très chaleureusement d'être présente pour la fin de mon parcours d'interne, toi qui m'as vu évoluer depuis le stage au CRPV jusqu'à ces 4 dernières années. L'équipe qui s'y est formée (Léa, Xavier, Marion et Joachim) restera comme l'un de mes meilleurs souvenirs de ma vie d'interne.



Faculté des Sciences Pharmaceutiques

Je tenais à remercier le Pr Patrick DALLEMAGNE, directeur du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN), de m'avoir accueilli durant 9 mois pour réaliser ce travail.

Je tenais à remercier toutes les équipes du CERMN pour leur accueil et leur bonne humeur quotidienne. L'amitié que je leur porte a depuis longtemps dépassé celle du simple cadre de travail. Alors merci à tous (et en particulier à ceux du 1^{er} étage, Willy, Sophie, Marc, Audrey, Line) pour avoir facilité mon intégration dans votre équipe et avoir su supporter aussi bien l'OVNI que je suis.

Je tenais à remercier l'équipe pédagogique du Master 2 Nanomédecines de l'université d'Angers et de l'unité Micro et Nanomédecines Biomimétiques pour m'avoir aussi bien formé et préparé au travail qui serait le mien au CERMN pour cette thèse.

Je tenais aussi à remercier le Pr Frédéric LAGARCE et le Pr Alain PINEAU qui auront toujours su être disponibles pour leurs étudiants et qui se sont chacun révélés d'excellents conseils avant, pendant et j'en suis persuadé, après mon parcours d'interne en Pharmacie.

Je tenais à remercier très largement l'ensemble de mes futurs confrères que j'ai pu côtoyer sur les bancs de l'amphi de P1 jusqu'à la section internat à la fac de Nantes, aux copains de corpo nantais ou d'ailleurs, aux copains normands de l'internat (pharmaciens ou carabins) pour tous ces moments inoubliables qui font la vie d'étudiant. Pour la plupart d'entre eux, nous nous sommes perdus de vue, mais où que vous soyez, une partie affective de ce travail vous est dédiée et peut être un jour nous reverrons-nous.

Mais tous ne sont pas oubliés. Je tiens ici à remercier la personne qui a le plus compté pour moi dans mes études, mon binôme de fac, mon témoin de mariage, le Dr Nicolas ALLAIRE. Merci de m'avoir aussi bien guidé dans tous ces cours si magistraux, ces horaires trop matinaux qui suivaient des nuits trop floues. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est pour beaucoup grâce à toi. Alors du fond du cœur, merci Nico !

Et s'il ne devait rester que les meilleurs, je les garderai pour la vie. Le Dr Mamour Armel BETTAN mon vieil ami chez l'ennemi (ce cher carabin qui aurait voulu être pharmacien s'il en avait eu le courage), tant de temps a passé depuis les bancs des TD de chimie ana de M. MASSON, c'en est déprimant (heureusement que tu as coupé ces cheveux). M le Dr des flammes Baptiste PAILLAT,



mon très cher ami d'enfance et parrain de mon fils (j'espère que tu sauras lui transmettre autre chose que le levé de coude légendaire de son père). M. le financier oriental, Gandhi BOUKACHABINE, ami de trop longue date et qui de par son travail, de trop longue distance (je persiste à penser qu'un jour tu nous reviendras dans ta Vendée natale pour de bon !). M. le doyen des étudiants, le presque docteur (allez encore 3 ans !) Vincent DUBOIS, mon ami caennais, puisses-tu être heureux avec Léopold autant que nous le sommes avec Mathis (et que cela continue encore de nombreuses années ...).

Je tenais à remercier aussi ma famille paternelle et maternelle. Vous avez tous su m'apporter bonheur et fierté durant mon enfance et encore maintenant. Je suis heureux de poursuivre la transmission du savoir et de l'histoire de notre famille.

Je tenais aussi à avoir une pensée émue en cette fin de thèse pour mes deux grands-mères, Monique ADNET et Josiane BALESTE, à qui cette thèse est dédiée, et directement à leurs époux, André ADNET, mon grand-père que je n'ai pas connu mais qui aurait tant eu à m'apprendre, et André BALESTE, qui est tout ce qu'un enfant peut rêver de son arrière-grand-père, comme celui que j'ai eu.

Grand-mère, tu es partie trop tôt, avant de rencontrer Mathis.

Mamie, tu luttas bravement contre cette maladie qui enlève ce que l'éducation a mis dans la personne et fait remonter le cœur en surface, je serai près de toi très bientôt.

Toutes les deux vous ne pouvez-être là aujourd'hui, mais je sais que quelque part, vous pensez à nous et que nous, nous continuons de vous aimer.

Je tenais à remercier ma mère, mon père et mon frère, Pierre Elliot, sans qui je ne serai pas là. A mes parents, Florence et Patrick, que j'aime par-dessus tout je vous dis merci, merci de m'avoir permis de réaliser ces études et de m'avoir donné tous les moyens de réussir, merci de m'avoir accompagné dans cette aventure qui, malheureusement nous éloigne un peu plus à chaque étape, mais sachez que vous êtes toujours près de moi et cela à chaque grande étape de ma vie. A mon père je le remercie de m'avoir toujours poussé à réaliser de grandes études. J'espère qu'aujourd'hui ce travail saura te rendre fier de ton fils et de ta famille. A ma mère, je te remercie pour ta présence dans les moments de bonheur mais aussi de tristesse qui se sont présentés durant ma vie étudiante. Tu as toujours été la motivation qui m'a poussé à avancer et tu sais au combien, si je suis en voie de devenir un pharmacien accompli en ce jour, c'est plus que qui compte grâce à toi.



Je tenais à remercier enfin celle sans qui je ne serai pas là aujourd'hui, celle qui a su me faire confiance, me comprendre, m'aimer malgré nos différences. Je ne vis que dans le bonheur de pouvoir partager avec toi tous ces moments de vie à deux et maintenant à trois. Justine ce travail de thèse est aussi le fruit de ton affection et de ton accompagnement et j'espère me montrer digne de l'amour que tu me portes dans notre vie à venir.

*Mathis, mon fils, tu es la plus belle réussite de ma vie.
Tu auras bientôt 5 mois au moment de présenter cette thèse.*

*Puissent tes grands-parents, ta mère et ton père,
de par l'éducation et l'amour que nous t'aurons transmis,
te rendre fier quand tu auras l'âge de lire ces quelques lignes.*



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX	7
I. INTRODUCTION.....	8
II. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	10
A. LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	10
1. Définition.....	10
2. Epidémiologie.....	11
3. Coût pour la société en France.....	11
4. Clinique de la maladie d'Alzheimer.....	12
4.1. Symptômes	12
4.2. Diagnostic.....	13
4.2.1. Entretien médical	13
4.2.2. Outils d'évaluation des fonctions cognitives.....	13
4.2.3. Imagerie cérébrale	14
4.2.4. Dosages biologiques.....	15
5. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.....	15
5.1. Modification de la phosphorylation des protéines Tubule Associated Unit (tau).....	16
5.2. L'Amyloid Precursor Protein (APP).....	17
5.3. Les plaques amyloïdes	19
5.4. Hypothèse cholinergique	20
5.5. Transmission glutamatergique.....	21
6. Traitements de la maladie d'Alzheimer	22
6.1. Inhibiteurs de l'AcHé et de la BuChE.....	23
6.1.1. Donépézil (Aricept®).....	24
6.1.2. Galantamine (Reminyl®).....	24
6.1.3. Rivastigmine (Exelon®).....	25
6.1.4. Prescription et effets indésirables	25
6.1.5. Surveillance et interactions médicamenteuses	26
6.2. Antagonistes des récepteurs NMDA : Mémantine (Ebixa®)	26
6.3. Intérêt dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.....	28
6.4. Perspectives thérapeutiques.....	28

B.	PROPRIETES ET ADMINISTRATION DE LA MOLECULE D'INTERET DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL DE THESE	29
1.	<i>Molécule d'intérêt</i>	29
2.	<i>Voie intranasale</i>	30
2.1.	<i>Fonctions de la voie nasale</i>	30
2.2.	<i>Anatomie et physiologie de la voie intranasale</i>	31
2.3.	<i>Mécanismes d'absorption</i>	32
2.3.1.	<i>Mucus et principe actif</i>	33
2.3.2.	<i>Mucines</i>	34
2.3.3.	<i>Drainage mucociliaire</i>	35
2.3.4.	<i>Facteurs influençant l'absorption nasale</i>	35
2.4.	<i>Avantages et inconvénients de la voie intranasale</i>	36
2.5.	<i>Formes pharmaceutiques adaptées à la voie nasale</i>	36
C.	FORMES GALENIQUES ETUDIEES DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL DE THESE.....	37
1.	<i>Hydrogels</i>	37
1.1.	<i>Définition</i>	38
1.2.	<i>Hydrogel de poloxamères</i>	40
1.2.1.	<i>Nature chimique des poloxamères</i>	40
1.2.2.	<i>Gels thermosensibles à base de poloxamères</i>	42
1.3.	<i>Hydrogels mucoadhésifs</i>	43
1.3.1.	<i>Définition de la mucoadhésion</i>	43
1.3.2.	<i>Polymères mucoadhésifs</i>	44
2.	<i>Liposomes</i>	45
2.1.	<i>Applications thérapeutiques</i>	45
2.2.	<i>Liposomes et voie intranasale</i>	46
2.3.	<i>Composition</i>	46
2.3.1.	<i>Phospholipides</i>	47
2.3.2.	<i>Cholestérol</i>	49
2.4.	<i>Classification des liposomes</i>	50
2.5.	<i>Méthodes de préparation des liposomes</i>	51
2.5.1.	<i>Hydratation d'un film lipidique</i>	51
2.5.2.	<i>Extrusion</i>	52
2.6.	<i>Caractérisation physico-chimique des liposomes</i>	53
2.6.1.	<i>Détermination des propriétés granulométriques des liposomes</i>	54
2.6.2.	<i>Détermination du potentiel ζ des liposomes</i>	55
2.7.	<i>Devenir des liposomes et libération du principe actif</i>	56

III. PROBLEMATIQUE	58
IV. MATERIELS ET METHODES	59
A. MATERIELS	59
B. METHODES.....	60
1. <i>Caractérisation des propriétés du PA.....</i>	<i>60</i>
1.1. <i>Evaluation in vitro de son activité inhibitrice de l'AChE et de la BuChE.....</i>	<i>60</i>
1.2. <i>Evaluation in vitro de la compétition au site périphérique de l'AChE par le propidium</i>	<i>60</i>
1.3. <i>Détermination de la perméabilité du PA par méthode PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay).....</i>	<i>61</i>
2. <i>Formulation et caractérisation des propriétés du gel.....</i>	<i>61</i>
2.1. <i>Préparation des solutions de polymères.....</i>	<i>61</i>
2.2. <i>Détermination de la température de transition sol-gel.....</i>	<i>61</i>
2.3. <i>Etude en rhéologie des hydrogels.....</i>	<i>62</i>
2.4. <i>Détermination du pH et de l'osmolarité des gels</i>	<i>62</i>
3. <i>Formulation et caractérisation des liposomes.....</i>	<i>62</i>
3.1. <i>Préparation des liposomes.....</i>	<i>62</i>
3.2. <i>Propriétés granulométriques et propriétés de surface des liposomes</i>	<i>63</i>
3.3. <i>Purification des solutions de liposomes par séparation colonne de gel SephadexTM</i>	<i>63</i>
3.4. <i>Dosage des liposomes par méthode Derived Count Rate (DCR).....</i>	<i>64</i>
3.5. <i>Dosage du PA par UHPLC.....</i>	<i>64</i>
3.6. <i>Détermination du taux d'encapsulation</i>	<i>65</i>
4. <i>Préparation et caractérisation des gels contenant des polymères mucoadhésifs ou les liposomes.....</i>	<i>65</i>
4.1. <i>Préparation des gels contenant les liposomes.....</i>	<i>65</i>
4.2. <i>Préparation des gels contenant des polymères mucoadhésifs.....</i>	<i>66</i>
4.3. <i>Caractérisation des gels modifiés</i>	<i>66</i>
6. <i>Etudes de mucoadhésion</i>	<i>66</i>
7. <i>Cinétiques de libération</i>	<i>67</i>
V. RESULTATS.....	68
1. <i>Caractérisation des propriétés du PA.....</i>	<i>68</i>
1.1. <i>Evaluation in vitro de son activité inhibitrice de l'AChE et de la BuChE.....</i>	<i>68</i>
1.2. <i>Détermination de la perméabilité du PA à travers la BHE par méthode Pampa.....</i>	<i>68</i>
2. <i>Formulation et caractérisation des gels.....</i>	<i>69</i>
2.1. <i>Gels thermosensibles à base de poloxamère 407 (P407)</i>	<i>69</i>
2.2. <i>Gels thermosensibles à base de P407 et de P188.....</i>	<i>70</i>

2.3.	<i>Gels de poloxamères contenant le PA</i>	72
2.4.	<i>Incorporation de polymères mucoadhésifs dans des hydrogels à base de P407 et de P188</i>	72
3.	<i>Formulation et caractérisation de liposomes de principe actif.....</i>	73
3.1.	<i>Caractérisation des propriétés granulométriques et de surface des liposomes.....</i>	73
3.2.	<i>Encapsulation du PA dans les liposomes</i>	74
3.2.1.	<i>Faisabilité de la séparation du PA encapsulé dans les liposomes du PA libre.....</i>	74
3.2.2.	<i>Caractérisation des performances d'encapsulation après mise en œuvre des techniques de séparation.....</i>	75
3.3.	<i>Formulation et caractérisation de différentes formulations</i>	75
4.	<i>Etudes de mucoadhésion</i>	77
5.	<i>Cinétiques de libération</i>	78
VI.	DISCUSSION	80
VII.	CONCLUSION / PERSPECTIVES.....	89
VIII.	BIBLIOGRAPHIE	91
IX.	ANNEXE	107

Liste des Figures

Figure 1: Diagnostic différentiel des démences communes (11).	10
Figure 2: De gauche à droite, Aloïs Alzheimer et Auguste D.	16
Figure 3: Dégénérescence neurofibrillaire de la MA mise en évidence par l'imprégnation argentique de Bodian (41).	16
Figure 4 : Schématisation du métabolisme de l'APP et la génération des peptides A β (49).	18
Figure 5 : La cascade amyloïde (51).	19
Figure 6 : Coloration de plaques d'amyloïdes argentique (A) et à la thioflavine (B) (49).	20
Figure 7 : Principal moyen de transmission cholinergique au travers d'une synapse cholinergique (67).	21
Figure 8 : Récepteur NMDA au repos (a) et sous sa forme activée (b).	22
Figure 9: Structure chimique du Donépézil, d'après www.drugbank.ca	24
Figure 10: Structure chimique du Galantamine, d'après www.drugbank.ca	24
Figure 11: Structure chimique de la Rivastigmine, d'après www.drugbank.ca	25
Figure 12: Structure chimique de la Mémantine, d'après www.drugbank.ca	26
Figure 13: Mécanisme d'action de la Mémantine (81).	27
Figure 14 : Schéma représentatif des voies physiopathologiques de la MA ainsi que les causes moléculaires et les cibles pharmacologiques aujourd'hui au centre de la recherche dans le but de modifier son évolution (85).	28
Figure 15 : Interaction entre récepteurs nicotiniques pré synaptiques et récepteurs adrénergiques post synaptiques (88).	29
Figure 16 : Schéma du mécanisme d'action du PA d'intérêt.	30
Figure 17 : Anatomie des voies aériennes supérieures (92).	31
Figure 18 : Système olfactif en dessin et vue en microscopie électronique de la surface de la muqueuse olfactive, d'après www.cnrs.fr	32
Figure 19 : Voies d'accès des principes actifs (PA) au SNC via une administration dans la cavité nasale d'après (94).	33
Figure 20 : Schéma de la voie olfactive et les possibles voies de diffusion d'un PA vers le SNC, d'après Samaridou et al. (95).	33
Figure 21: Structure moléculaire de la mucine nasale. (100).	34
Figure 22 : Nombre de publications relatives aux hydrogels entre 1995 et 2010. (114).	38
Figure 23 ; Classification des hydrogels inspiré par Patel et al. (117)	39
Figure 24 ; Classification des différents types de stimuli pour les hydrogels "intelligents" inspiré par Patel et al. (117)	40
Figure 25 : Exemples de blocs hydrophobes constituant les copolymères entrant dans les formulations d'hydrogels thermosensibles. (118)	40
Figure 26 : Formule chimique d'un copolymère de poloxamères. (119)	41
Figure 27 : Mécanisme de gélification du P407 dans l'eau. (123)	42
Figure 28 : Etapes de contact et de consolidation de la mucoadhésion. (126)	44
Figure 29: Les différents types de liposomes et PA / ligands utilisables (133).	46
Figure 30 : Structure d'un phospholipide (ici de la phosphatidylcholine), d'après www.avantilipids.com .	47
Figure 31 : Représentation schématique de la réorganisation des lipides, d'après Motta (143)	48
Figure 32 : Structure du cholestérol, d'après www.drugbank.ca	50

Figure 33 : Classification des liposomes selon leur taille et leur lamellarité (148).	51
Figure 34 : Principe de préparation des liposomes par hydratation d'un film lipidique, d'après Burgess (1998).	52
Figure 35 : Photographie et composition d'un extrudeur, tirés de www.avantilipids.com	53
Figure 36 : Photographie d'un granulomètre (Malvern NanoZetasizer®) et principe d'analyse par diffusion dynamique de la lumière, tiré de www.malvernpanalytical.com	54
Figure 41 : Disposition des ions autour d'une particule et détermination du potentiel ζ , tiré de www.malvernpanalytical.com	55
Figure 42 : Libération de PA encapsulé dans un liposome après une interaction liposome - cellule de (150).	56
Figure 39 : Schéma d'une cellule de Franz.	56
Figure 40 : T°sol-gel déterminée en fonction de la proportion en P407 par observation visuelle.	69
Figure 41 : Modules élastique G' et visqueux G'' d'un hydrogel contenant 17,5 % (m/m) de P407 avec une contrainte de cisaillement fixée à 25 Pa et une fréquence d'oscillation à 1 Hz.	70
Figure 42 : Valeurs d'osmolarité (A) et de T°sol-gel (B) des formulations réalisées avec différentes proportions de P407/P188/eau (m/m).	71
Figure 43: Modules élastiques G' et visqueux G'' d'un hydrogel de P407/188 15/1 (% m/m) avec une contrainte de cisaillement fixée à 25 Pa et une fréquence d'oscillation à 1 Hz.....	72
Figure 44 : Effets de l'ajout d'HPMC, gomme gellane ou chitosan en proportions variables sur la T° _{sol-gel} (A) et l'osmolarité (B) d'une solution de P407/188 15/1 (% m/m).	73
Figure 45 : Fractionnement des liposomes du lot Lipo-5 (dosés par détermination du nombre de coups) et du PA (dosé par UHPLC) après séparation sur colonne SephadexTM.....	74
Figure 46 : Détermination de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement d'une formulation de P407/188 15/1 (% m/m) (A) + Liposome 60 mM (B) ou 120 mM (C).....	77
Figure 47 : Evaluation des modules G' (ronds pleins) et G' (ronds vides)' en fonction d'une contrainte oscillante croissante à 50 °C.	77
Figure 48 : Force de détachement et travail d'adhésion de différentes formulations (% m/m, valeurs moyennes $\pm$ écart type, n=4 ; *VS 15/1 p<0,01 ; **VS 15/1 p<0,001).....	78
Figure 49 : Profils de diffusion cinétique de PA à 1 mg/mL dans différentes formulations d'intérêt (n=2).	78

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différences entre poloxamère 407 (P407) et poloxamère 188 (P188) et caractéristique des poloxamères les plus couramment utilisés (Pharmacopée Européenne 7.0, 2008).....	41
Tableau 2 : Avantages et perspectives de hydrogels solution - gel.	43
Tableau 3 : Propriétés physicochimiques du chitosan, de l'HPMC et de la gomme gellane, modifié d'après Asane et al., 2008 (127).	44
Tableau 4 : Groupement spécialisés rattachés au groupement phosphate des phospholipides.	47
Tableau 5 : Principaux phospholipides employés dans la formulation de liposomes.....	49
Tableau 6 : Cahier des charges et critères qualités optimales des gels à formuler.	58
Tableau 7 : Paramètres de gradient pour analyse UHPLC.....	64
Tableau 8 : Evaluation de l'activité inhibitrice de l'AChE et de la BuChE.	68
Tableau 9 : Evaluation de la perméabilité par méthode Pampa.	68
Tableau 10 : Propriétés d'encapsulation des liposomes après purification.....	75
Tableau 11 : Résumé des principales propriétés d'une formulation adaptée à la voie intra nasale et celles des gels formulés.....	76
Tableau 12 : Propriétés granulométriques et de surface des liposomes contenus dans les différentes formulations (n=3).....	76
Tableau 13 : Composition et caractérisation physique des liposomes (*ratio molaire de SPC ou EPC / cholestérol ; * ² Valeurs moyennes $\pm$ écart type, n=3 ; Conditions réhydratation : A : Vortex 2 min, 20 °C ; B : 30 min, 80 tpm, 20 °C ; C : 1h, 80 tpm 40 °C ; D : 30 min ; E : 30 minutes d'agitation magnétique (80 tpm) à 40 °C combinées à 1 minute de vortex	107
Tableau 14 : Variation des propriétés granulométriques et de surface après mise en œuvre de la séparation sur colonne et détermination du taux d'encapsulation de différentes formulations de liposomes.	107

I. Introduction

Le Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie a été créé par le Pr Max Robba en 1974 et est actuellement dirigé par le Pr. Patrick Dallemagne. Ce laboratoire de recherche académique spécialisé dans le Drug Design est rattaché à la faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'UFR Santé de l'Université de Caen Normandie. L'équipe du CERMN travaille sur la recherche et la mise au point de nouveaux composés d'intérêt thérapeutique dans les domaines de la cancérologie et des neurosciences (maladie d'Alzheimer) selon deux adressages scientifiques : la polypharmacologie (1) et les interactions protéine-protéine (2). Quatre plateformes ont été créées pour soutenir ces 2 thématiques : les plateformes de Chimie Organique et Médicinale, Chimiothèque, de Chemoinformatique et de Screening et Drugabilité. C'est au sein de cette dernière que s'est déroulé mon stage d'internat pour l'obtention du diplôme d'étude spécialisé en pharmacie hospitalière, sous la supervision du Pr Aurélie Malzert-Fréon et du Dr Anne-Claire Groo.

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui touche actuellement près de 850 000 personnes en France et 48 millions d'individus dans le monde (3). Caractérisée par des symptômes évolutifs d'agnosie, amnésie, aphasie et apraxie, elle résulte d'un processus multiple associé à la formation de plaques séniles extracellulaires, résultant de l'association du peptide β -amyloïde et à une dégénérescence neurofibrillaire liée à une hyperphosphorylation et une agrégation de la protéine *tau* dans l'espace intraneuronal (4). Les stades avancés de la MA sont caractérisés par une diminution de l'expression de l'acétylcholinestérase (AChE) dans le système nerveux central (SNC) du fait de la neurodégénérescence, avec cependant le maintien ou l'augmentation progressive des niveaux de la Butyrylcholinestérase (BuChE) cérébrale (5). Or, la BuChE dégrade physiologiquement, comme l'AChE, l'acétylcholine (ACh). En conséquence, l'inhibition sélective de la BuChE, si elle intervient au niveau central, semble présenter un intérêt thérapeutique dans les stades avancés de la MA (6,7).

Le principe actif (PA) qui fait l'objet de la présente étude est une prodrogue qui est capable lors de son hydrolyse d'inhiber de façon covalente et pseudo-irréversible la BuChE. Le composé étudié pourrait constituer un principe actif (PA) pléiotrope d'intérêt symptomatique et curatif dans la MA. Pour ce faire, il doit exercer ses activités au niveau central pour ne pas risquer de générer des effets secondaires importants, en particulier au niveau cardiaque. Cependant, son caractère hydrophile risque de le rendre inapte à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) après administration orale ou intraveineuse.

La voie intranasale pourrait permettre de court-circuiter la BHE puisqu'un PA administré dans la cavité intranasale peut atteindre directement le SNC par le biais de la muqueuse olfactive, du nerf olfactif ou en s'intégrant dans le réseau nerveux trigéminé. Toutefois, cette voie n'est pas sans limitation car la forme galénique instillée dans la cavité nasale sera soumise à l'action des enzymes présentes et pourra faire l'objet d'une élimination mucociliaire très rapide si ses propriétés rhéologiques ne sont pas optimisées (8).

Les hydrogels sont des formes galéniques particulières qui peuvent être administrés sous forme de solution et qui dans certaines conditions peuvent gélifier *in situ* en réponse à un stimulus externe tel que la température (9). Pour optimiser la rémanence du gel ainsi formé dans la cavité intranasale, il peut être avantageux d'avoir recours à des formes mucoadhésives en incorporant à la formulation galénique des excipients mucoadhésifs

Enfin, afin d'assurer la protection du PA hydrophile véhiculé dans un hydrogel thermosensible et mucoadhésif administré dans la cavité intranasale et également pour maîtriser et prolonger sa durée de mise à disposition dans le SNC, il peut être avantageux d'avoir recours à une stratégie de vectorisation.

Compte tenu de ces différents éléments, l'objectif de ce travail est de développer et de caractériser une formulation susceptible de permettre la libération à dose efficace au niveau central d'un PA hydrophile d'intérêt thérapeutique potentiel dans le traitement de la MA après administration par voie intranasale.

II. Données bibliographiques

A. La maladie d'Alzheimer

1. Définition

La MA est un des grands syndromes démentiels. Ce syndrome démentiel se définit comme un trouble des fonctions cognitives (mémoire, langage, praxies,gnosies, fonctions exécutives). Selon l'*American Psychiatric Association*, ces troubles cognitifs doivent être suffisamment importants au cours des 6 mois précédents pour retentir sur la vie quotidienne du sujet. La démence constitue la forme la plus grave de vieillissement cérébral pathologique. Elle se manifeste par une altération croissante et irréversible des fonctions mnésiques et cognitives, ainsi que par des troubles du comportement conduisant à la perte progressive d'autonomie des malades. La démence est considérée actuellement comme une priorité mondiale de santé publique par l'Organisation Mondiale de la Santé, Il existe deux types de processus pathologiques impliqués dans la survenue d'un syndrome démentiel (10) :

- les atteintes vasculaires (20-30 % des cas)
- les processus neurodégénératifs (70-80 % des cas)

Ces processus neurodégénératifs regroupent des pathologies comme la démence à corps de Levy, la démence compliquant la maladie de Parkinson, la démence lobaire fronto-temporale, et la MA qui représente à elle seule 66 % des cas. L'ensemble de ces pathologies et les principales méthodes diagnostics qui permettent de les différencier sont illustrés dans la Figure 1.

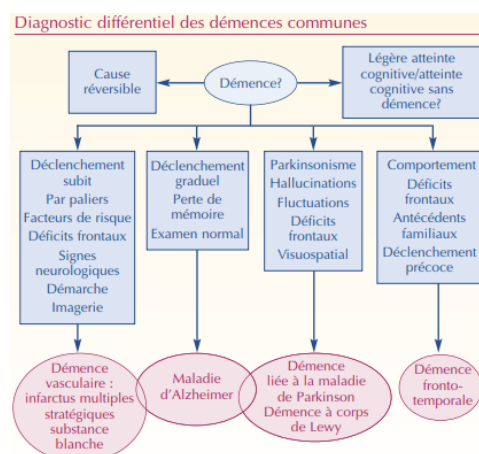


Figure 1: Diagnostic différentiel des démences communes (11).

2. Epidémiologie

Dans le monde, 1 nouveau cas de démence est diagnostiqué toutes les 3 secondes. 48 millions de personnes vivent actuellement avec une démence. Ce nombre pourrait tripler à 132 millions d'individus d'ici à 2050 avec l'allongement de l'espérance de vie (12). En France, les principales données épidémiologiques disponibles sont issues de l'étude PAQUID (Personnes âgées d'Aquitaine ou Quid des personnes âgées). C'est une étude de cohorte prospective réalisée depuis 1988 chez les personnes âgées de plus de 65 ans (13). Il apparaît ainsi qu'en France, 900 000 personnes sont atteintes de la MA et quelques 225 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année (3). La prévalence de la MA et des maladies apparentées représente en France près de 1 100 000 personnes et indirectement plus de 3 millions de personnes avec les proches des patients. La prévalence dans la population française est avant 70 ans : < 1 personne sur 100, entre 70 et 79 ans : 1 personne sur 25, entre 80 et 89 ans : 1 personne sur 5 et après 90 ans : 1 personne sur 3 (14). Les formes précoces de la MA concernent donc quelques 32 000 cas avant 60 ans et 1000 cas avant 50 ans (15). La MA semble atteindre plus généralement les femmes que les hommes avec une proportion respective d'individus touchés par la MA après 75 ans de 20,5 et 13,2 %. Ces résultats sont aussi à contraster avec l'espérance de vie plus élevée chez les femmes (85,7 vs 79,9 ans entre 2015 et 2020) qui les conduit à développer plus fréquemment une démence (16).

3. Coût pour la société en France

Selon un rapport de la fondation Médéric Alzheimer (17), le coût global estimé de la MA est de 32 milliards d'euros en France. Ce coût global de la MA comprend plusieurs secteurs de dépense :

- Coûts médicaux et paramédicaux du secteur sanitaire : 5,3 milliards d'euros par an. Ces coûts correspondent à l'établissement du diagnostic, aux soins des personnes malades à leur domicile, à leur prise en charge en établissement de santé. Ces coûts ne comprennent pas la prise en charge médico-sociale.

- Coût de l'aide informelle : 14 milliards d'euros par an. L'aide informelle est l'aide prodiguée par une personne de l'entourage de la personne malade (conjoint le plus souvent) telles que les soins d'hygiène corporelle, l'aide à l'habillage, à la marche, l'aide pour le ménage, la gestion du budget.

- Coût du médico-social : 13 milliards d'euros par an. Il s'agit de la prise en charge des soins par les établissements d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (EHPAD), Unités de soins de longue durée, équipes spécialisées Alzheimer et de la prise en charge professionnelle de la dépendance (à domicile, en institution et en hébergement).

Le reste à charge pour les familles est en moyenne de 1 000 euros/mois (personne malade à domicile : 570 euros/mois et personne malade en EHPAD : 2 300 €/mois). Ce reste à charge pour les familles s'est vu augmenter de 30 euros/mois en moyenne depuis le 1^{er} août 2018 (360 euros/an) par décision de la Haute Autorité de Santé (HAS). Ce coût correspond au déremboursement par la sécurité sociale des quatre médicaments symptomatiques de la MA (le Donépézil, la Mémantine, le Rivastigmine et la Galantamine). Cette décision fait suite à la décision de la commission de transparence de la HAS de réévaluer le niveau d'efficacité des traitements de la MA à deux reprises à la baisse, en 2011 et 2016, faisant évoluer le niveau de l'amélioration du service médical rendu (ASMR) de ces traitements de modeste à faible (18).

4. Clinique de la maladie d'Alzheimer

4.1. Symptômes

La MA est appelée maladie des « 4A ». Elle se caractérise par une liste de symptômes évolutifs (19–21) :

- Agnosie : non reconnaissance de personnes proches de son entourage et des objets
- Amnésie : perte de mémoire partielle ou totale
- Aphasie : troubles de la compréhension et du langage lu, écrit ou parlé
- Apraxie : mauvaise coordination des gestes

La MA se développe généralement sur une durée pouvant s'allonger sur 3 à 20 ans. Sa progression peut être schématisée en 3 phases cliniques (22) :

- Une première phase dite *infraclinique*, anatomo-pathologique, dans laquelle des lésions histologiques évolutives peuvent être observées sans signe clinique spécifique. Cette première phase dure entre 10 et 15 ans.

- Une deuxième phase dite *pré-démentielle*, caractérisée par des troubles de la mémoire à court et long terme, accompagnés de troubles de la communication et des changements des humeurs et du comportement (appelés symptômes « négatifs » : indifférence affective, dysphorie et apathie). Cette phase dure entre 2 et 4 ans.

- Une troisième phase dite *démentielle*. A ce stade, la personne devient incapable de communiquer et de réaliser seule les tâches du quotidien les plus simples. Des troubles du rythme circadien apparaissent entraînant des troubles du sommeil, associés à des troubles de l'alimentation (le plus souvent de l'anorexie conduisant à une dénutrition) (23–25). L'accompagnement et les soins prodigués à ces malades sont nécessaires 24 heures par jour. De par la nature progressive et irréversible de la maladie, ces symptômes continueront

à s'aggraver au fil du temps (26). Malgré la progression de la recherche pour identifier les processus moléculaires et cellulaires à l'origine de la MA, aucun facteur à l'origine de ces processus n'est connu avec certitude. Ces études sont d'autant plus complexes que la MA se présente sous deux formes : la forme familiale représentant 5 % des cas et les formes sporadiques apparaissant généralement après 65 ans (95 % des cas). A l'exception de l'âge d'apparition des premiers symptômes, aucune de ces deux formes de la MA ne peut être distinguée d'un point de vue clinique et biologique.

4.2. Diagnostic

Le diagnostic de la MA est un acte médical difficile, tardif et lent, environ 24 mois sont nécessaires en France entre l'apparition des signes productifs (agitation, irritabilité, agressivité, euphorie) et les signes non productifs (anxiété, dépression, apathie). Le seul diagnostic de certitude reste l'examen anatomopathologique du cerveau, au moment du décès du patient. La multitude d'examens vise à identifier la MA mais aussi à écarter toute autre pathologie démentielle (diagnostic différentiel).

4.2.1. Entretien médical

C'est le premier examen réalisé avec l'examen clinique en vue de poser un diagnostic de la MA. Celui-ci peut être réalisé en présence d'un ou plusieurs accompagnants afin de permettre au médecin d'obtenir un recueil fiable et le plus exhaustif possible d'informations médicales. Cet entretien vise à recueillir principalement l'âge du patient, ses antécédents médicaux (troubles vasculaires, pulmonaires, pathologies héréditaires, ...), son mode de vie et l'histoire de sa maladie (évolution des symptômes, évolution de sa maladie et retentissement de celle-ci sur son quotidien).

4.2.2. Outils d'évaluation des fonctions cognitives

Il existe de nombreux tests de dépistages disponibles pour la MA et les syndromes démentiels en général. Nous pourrions citer par exemple le test de l'horloge (évaluation temporo-spatiale) (27), le test des 5 mots de Dubois (capacité de mémorisation) (28) et le test de la perte d'autonomie fonctionnelle (définissant le degré de dépendance du patient dans la vie quotidienne) (29). Il existe cependant un test dont le score permettra de définir la présence de troubles cognitifs chez un patient souffrant de syndrome démentiel. Ce test est le *Mini-Mental State Examination* (MMSE).

Ce score MMSE permet d'évaluer par une série de questions l'état cognitif global du patient :

- Orientation temporelle : date du jour, mois, saison, année.
- Orientation spatiale : nom de l'hôpital, de la ville, du département, de la région.
- Fonctions d'apprentissage : mémorisation et restitution de 3 mots à la suite.
- Fonction d'attention et de calcul : Soustraction de 7 en 7 à partir de 100.
- Fonctions de mémoire : restitution des 3 mots cités précédemment.
- Fonctions du langage : nommer des objets présents lors du test et la réalisation d'ordres simples de manipulation de ces derniers.
- Fonctions de praxie : reproduction d'un dessin, d'une figure.

Ce test a pour but d'évaluer l'ensemble des fonctions cognitives altérées par la MA. Pour chaque bonne réponse, un point est attribué. Le score du test peut varier de 0 à 30 points et permet de déterminer selon une échelle de score le stade de démence du patient (30,31):

- MMSE $\geq$ 28 : Absence de démence, nul
- MMSE 21 - 26 : Démence légère
- MMSE 11 – 20 : Démence modérée
- MMSE $\leq$ 10 : Démence sévère

Le MMSE permet en plus d'évaluer l'état initial du patient, de quantifier les pertes de fonctions cognitives de ce dernier si le test est répété dans un intervalle de temps suffisamment long. Ce test peut présenter des variations inter individuelles entre des patients d'un même stade de démence. Il semblerait que le niveau d'éducation et l'âge du patient fassent varier les performances des sujets. Une grille de lecture pour l'analyse des résultats du MMSE a été reformulée en 1993 pour permettre de comparer une sujet vis-à-vis d'un groupe référence (32)

4.2.3. Imagerie cérébrale

Cet outil diagnostique doit être systématiquement réalisé pour toute découverte récente de démence (HAS mars 2008). Cet examen permet d'avantage de ne pas méconnaître une autre cause de démence telle qu'un processus expansif (cancer et autres), une hydrocéphalie ou bien des séquelles d'accident vasculaire cérébral que de poser un diagnostic de démence. Les techniques d'imagerie cérébrale utilisent la technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM). Elle permet d'évaluer l'aspect de la substance blanche (myéline) et grise (noyaux gris centraux), la présence d'espaces modifiés caractéristiques (espaces de Virchow Robin) et le volume du SNC afin d'établir une première quantification de l'atrophie cérébrale, marquée par une réduction de la taille du cerveau ainsi qu'une

atrophie de l'hippocampe. Le déclin cognitif est corrélé avec la vitesse de réduction de l'hippocampe. Dans les formes modérées de la MA, la réduction est de 30 à 40 % et elle est de 20 à 30 % dans les formes légères. On peut aussi y observer des séquelles tardives de la MA comme des signes de démence vasculaire (lésions, hémorragies) (33).

4.2.4. Dosages biologiques

Des prélèvements sanguins sont prescrits pour obtenir un dosage de la thyroïdostimuline hypophysaire (TSH), un hémogramme, une protéine C réactive, une natrémie, une calcémie, une glycémie, une albuminémie et un bilan rénal (créatinine et sa clairance) pour écarter toute autre pathologie. De même un dosage de vitamine B12, un dosage de folates, un bilan hépatique (transaminases, gamma GT), une sérologie syphilitique, une sérologie du virus de l'immunodéficience humaine ou de la maladie de Lyme sont prescrits en fonction du contexte clinique. Un prélèvement du liquide céphalo-rachidien (LCR) pourra être réalisé à la suite d'une ponction lombaire. Il est possible de doser dans le LCR des marqueurs spécifiques de la MA comme une diminution de la concentration en peptide β amyloïde 42 ($A\beta_{42}$) (rétention dans les plaques amyloïdes entraînant une diminution de 2 à 3 fois la valeur normale soit 500 pg/mL) et une augmentation de la concentration en protéine *tau* (valeur normale de 300 pg/mL) et *tau*-phosphorylée (34,35). Cette analyse du LCR ne met pas en évidence les lésions de la maladie mais en est le reflet. Elle est fiable à 80 % quand le cheminement du patient a été respecté et intervient en complément de l'IRM.

5. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

Trois mécanismes pathogènes sont impliqués dans la survenue de la MA : les pertes synaptiques, la mort neuronale et l'inflammation. La pathogénicité de la MA résulte de processus cellulaires et moléculaires multiples aboutissant à l'apparition de lésions tissulaires. Ces lésions caractéristiques sont la conséquence de la formation de plaques séniles amyloïdes extracellulaires dues au peptide β -amyloïde $A\beta_{42}$, et à une dégénérescence neurofibrillaire (DNF) due à des altérations du métabolisme de la protéine *tau* et son agrégation dans l'espace intraneuronal (4). La première observation de ces DNF a été réalisée en 1907 lors d'une autopsie d'une patiente considérée comme démente, Auguste D. Cet examen a été réalisé par Aloïs Alzheimer (dont la photographie ainsi que celle de sa patiente la plus célèbre est visible dans la Figure 2), médecin neurologue allemand devenu éponyme de cette maladie, à l'initiative du Dr Kraepelin en 1910 (36).



Figure 2: De gauche à droite, Aloïs Alzheimer et Auguste D.

Les lésions tissulaires peuvent être aussi la conséquence de processus annexes comme des mécanismes inflammatoires, avec une prolifération des cellules astrocytaires (cellules de soutien du SNC) et microgliales (cellules d'«épuration» du SNC, principalement par la phagocytose). De plus, il existe aussi des dépôts annexes du A β 42 dans la paroi des artères à l'origine de l'apparition d'une angiopathie amyloïde pouvant provoquer des hémorragies cérébrales. L'ensemble de ces lésions semble être à l'origine de la perte neuronale associée à la MA.

5.1. Modification de la phosphorylation des protéines *Tubule Associated Unit* (*tau*)

Les DNF visibles dans la Figure 3, sont des dépôts filamenteux intra neuronaux constitués majoritairement d'une protéine anormalement hyperphosphorylée, la protéine *tau* (37,38).

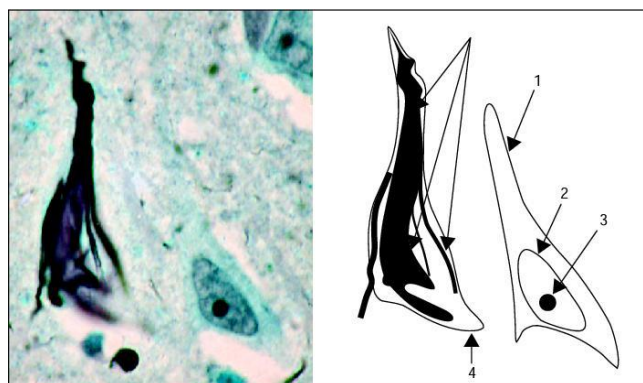


Figure 3: Dégénérescence neurofibrillaire de la MA mise en évidence par l'imprégnation argentique de Bodian (41).

Le corps cellulaire du neurone dont le contour est à peine visible (4) contient une dégénérescence neurofibrillaire (flèches indiquant une trame noire).

Ces fibres sont de formes hélicoïdales et sont alors appelées *Paired Helical Filament* (39). La protéine *tau* de la famille des Protéines Associées aux Microtubules (*MAP*) est principalement exprimée dans les neurones (40). Il existe 6 différents isoformes de la protéine *tau* qui se différencient par leur région de fixation aux microtubules (protéines composées de dimères de tubuline, assurant le rôle de structurant cellulaire et de transport intracellulaire).

En condition physiologique, la protéine *tau* participe à la polymérisation de la tubuline en dimères de tubuline et à la stabilisation des microtubules. En condition pathologique la protéine *tau* perd son caractère soluble tout en formant des structures filamenteuses. Dans la MA, les différents isoformes de la protéine *tau* sont anormalement hyperphosphorylés. Cette modification des propriétés physico-chimique de la protéine *tau* diminue son affinité vis-à-vis des microtubules, entraînant une instabilité microtubulaire et une dégénérescence neuronale (38,41). Il existe une forte corrélation entre la survenue de la MA et l'apparition de ces DNF, à la fois dans le temps (augmentation du nombre de DNF et aggravation des signes cliniques) mais aussi dans l'espace (localisation des DNF dans le SNC) (42). Cette corrélation entre l'anatomopathologie et la clinique a permis de définir clairement 6 stades pathologiques permettant de quantifier l'imprégnation des DNF au moment du diagnostic anatomopathologique (43). Cependant ces DNF ne sont pas spécifiques de la MA et sont présentes dans d'autres syndromes démentiels.

5.2. L'Amyloid Precursor Protein (APP)

La MA dans toute ses formes, semble donc être liée à la perturbation du métabolisme de la protéine *Amyloid Precursor Protein* (APP). C'est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la famille APP. Ces protéines sont exprimées de façon ubiquitaire dans le corps humain avec une expression plus forte au niveau du cortex cérébral (44). Des données expérimentales réalisées chez la souris exprimant un gène muté codant pour l'APP montrent que cette mutation peut entraîner de nombreux troubles : prolifération gliale, diminution de la longueur des dendrites neuronales, diminution de la survie de neurones en cultures. Ces observations tendent à justifier les recherches scientifiques récentes se tournant vers l'APP et son possible rôle clef dans le maintien de l'intégrité neuronale (45,46). La protéine APP est métabolisée et clivée selon deux voies principales : la voie amyloïdogène et la voie non amyloïdogène, qui se distinguent principalement par les protéines clivantes (protéases sécrétases) et les métabolites produits. Les principales mutations connues du gène codant pour l'APP et conduisant à la MA, modifient l'APP à proximité des sites de clivages des sécrétases. En condition physiologique, l'APP subit un clivage séquentiel par l' α -sécrétase, puis par la γ -sécrétase, générant un peptide hydrosoluble et non toxique (47). En condition pathologique chez les patients atteints de la

MA, l'amyloïde ou l'A β , peptide insoluble de 4 kDa, est généré lors du clivage de l'APP par les β et γ -sécrétases (48), visible en Figure 4. Ce dernier est capable de s'auto-agréger pour former des fibrilles amyloïdes, des dépôts pré-amyloïdes diffus qui vont finir par former des plaques séniles extracellulaires caractéristiques de la MA.

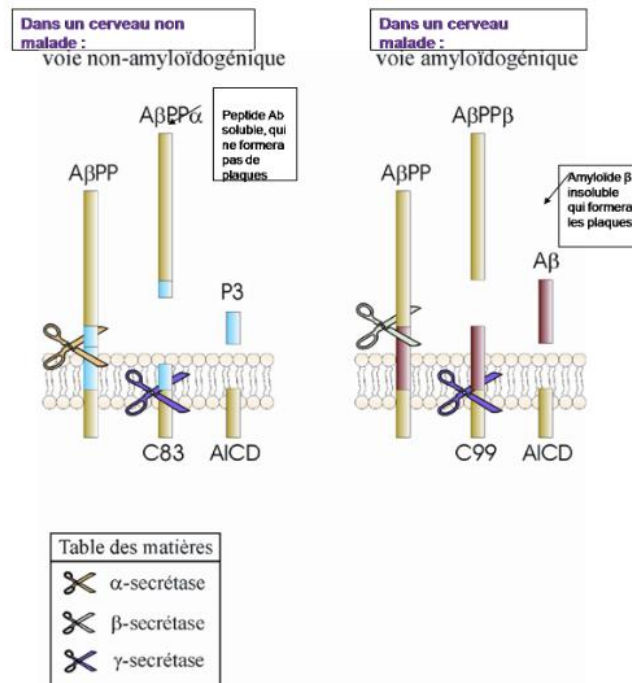


Figure 4 : Schématisation du métabolisme de l'APP et la génération des peptides A β (49).

Ce processus de production de l'amyloïde β a été décrit sous le terme de cascade amyloïde en 1992 par Hardy et Higgins (50) et est illustré dans la Figure 5. Cette cascade semble indiquer que l'apparition et le développement d'un métabolisme anormal de la protéine APP entraînent une agrégation de peptide A β qui peuvent ensuite devenir des oligomères d'amyloïde A β solubles, soit s'assembler avec d'autres composés et former des plaques dans le SNC. Il est actuellement établi que les oligomères d'amyloïde sont plus toxiques que les plaques elles-mêmes car ils activent les cellules microgliales, provoquant des réactions inflammatoires. Le résultat final de cette cascade est la mort neuronale.

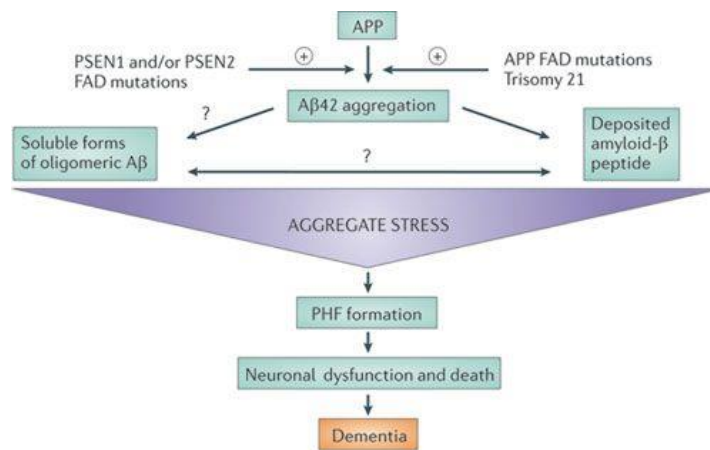


Figure 5 : La cascade amyloïde (51).

5.3. Les plaques amyloïdes

Initialement les dépôts d'amyloïdes se retrouvent de manière diffuse dans le SNC. Puis lors de la progression de la MA jusqu'à son stade final, ces derniers se retrouvent plus aisément dans les noyaux gris centraux et le cervelet (zones contrôlant la motricité et diverses fonctions cognitives et comportementales dites limbiques, c'est-à-dire la zone des émotions et de la motivation) (52). Les plaques amyloïdes sont le plus souvent retrouvées dans les régions corticales et sous corticales, l'hippocampe et l'amygdale. Elles peuvent être classées en 2 catégories distinctes :

- Les plaques diffuses qui sont les premières lésions dans le SNC des malades atteints de la MA (53). Elles sont retrouvées en plus grand nombre que les plaques séniles, dans des zones du SNC faiblement associées aux zones lésées classiquement par la MA. C'est aussi la raison qui explique leur présence chez des sujets sains.
- Les plaques séniles (ou plaques focales, compactes, neuritiques) sont des lésions extracellulaires du SNC.

Les plaques séniles amyloïdes sont des lésions extracellulaires d'un diamètre compris entre 15 et 200 μm , contenant des noyaux protéiques denses (Figure 6). Ces amas protéiques représentent les formes finales insolubles de l'agrégation des peptides β amyloïdes sous une conformation en feuillets- β plissés (54). La première mise en évidence de ces structures protéiques remonte à 1907 par l'observation du Dr. Alzheimer par l'utilisation d'une technique d'imprégnation de Bielschowsky à base de sels d'argent (55). Une trentaine d'autres composés de ces plaques amyloïdes ont ensuite été décrits, en particulier la protéine α -synucléine, ou encore l'Apolipoprotéine E et ses récepteurs (56), des héparanes sulfates (57) et des composés métalliques comme le zinc et le fer (58,59).

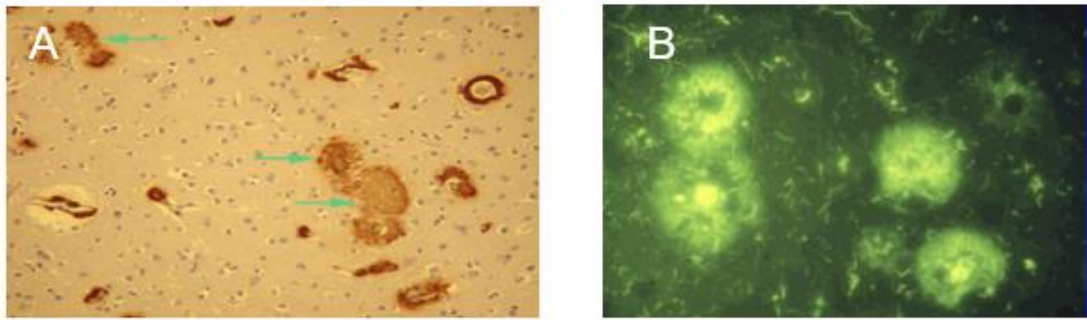


Figure 6 : Coloration de plaques d'amyloïdes argentique (A) et à la thioflavine (B) (49).

Une fois que la MA se développe en raison des diverses causes décrites ci-dessus, les neurones et les synapses cholinergiques sont affectés et se dégradent progressivement jusqu'à disparaître. De nombreuses régions du cerveau présentent alors des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires. Il ne semble pas exister de superposition entre les plaques d'amyloïdes et les DNF. Avec la disparition de ce réseau neuronal, la mémoire et les fonctions cognitives diminuent progressivement parallèlement à la progression de la démence, tout en accélérant la mort du patient (5,60,61). Les plaques amyloïdes vont perturber la transmission entre les neurones cholinergiques car elles empêchent la capture de choline. Cela entraîne un déficit de choline et une diminution d'un neuromédiateur spécifique, l'ACh.

5.4. Hypothèse cholinergique

Plusieurs hypothèses sont émises pour tenter d'expliquer la pathogenèse complexe de la MA parmi lesquelles la théorie cholinergique. Elle s'appuie sur un déficit objectivé de neurotransmission cholinergique dans le cerveau qui serait à l'origine des troubles cognitifs de la MA. Dans la seconde moitié des années 1970, des études neurochimiques sur des échantillons de tissu post-mortem de patients atteints de la MA ont montré que le système cholinergique neuronal central était particulièrement touché par cette maladie. La transmission cholinergique constitue la principale voie impliquée dans la physiopathologie des troubles cognitifs et non cognitifs de la MA. Cette transmission cholinergique sous-tend les principales voies d'action pharmacologique des traitements symptomatiques de la MA (62).

La transmission cholinergique au niveau d'une synapse neuronale est illustrée dans la Figure 7. Dans la MA, il a été observé une diminution de l'activité de la choline acétyltransférase (AChT), enzyme permettant la métabolisation de l'ACh à partir d'acétyl-CoA. Cette diminution de production de l'ACh entraîne une diminution de sa concentration dans la fente synaptique (espace intercellulaire entre un axone neuronal « émetteur » d'ACh et un corps cellulaire de neurone « récepteur ») (60,63,64), ainsi qu'une diminution de

l'activité de l'acétylcholinestérase corticale (65,66). Ce déficit cholinergique dans la fente synaptique entraîne aussi une modification de la densité des récepteurs à l'ACh à la surface des corps neuronaux et des boutons synaptiques.

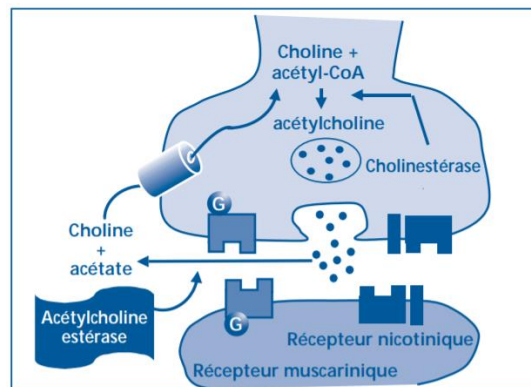


Figure 7 : Principal moyen de transmission cholinergique au travers d'une synapse cholinergique (67).

Il existe deux types de récepteurs transmembranaires à l'ACh qui sont : les récepteurs muscariniques et les récepteurs nicotiniques. Il en résulte pour les récepteurs muscariniques, une diminution importante d'un sous type de récepteur (M2 pré synaptique) au niveau cortical et hippocampique. Les récepteurs M1 et M3 (post synaptiques) semblent relativement épargnés mais subissent altération traductionnelle de leur cascade intracellulaire (couplage et fonctionnement des protéines G, activité de la phospholipase C, activité et translocation de la Protéine Kinase C). Concernant les récepteurs nicotiniques, il est observé une diminution de leur expression en pré et post synaptique au décours de la MA. Les isoformes α -4 et α -7 semblent être plus impactés que les autres types de récepteurs nicotiniques. Ces modifications quantitatives et qualitatives des récepteurs à l'ACh ne sont qu'une forme conséquentielle de la perte de transmission cholinergique. Elle participe avec la formation de plaques amyloïdes, à l'établissement des désordres neurologiques cognitifs de la MA (68,69).

5.5. Transmission glutamatergique

Le glutamate (ou acide glutamique dans sa forme non ionisée) est un neurotransmetteur stimulateur des neurones post synaptiques le plus présent dans le SNC. Il possède un rôle primordial dans les fonctions d'apprentissage et mnésiques (plasticité synaptique) (70). Comme les autres neurotransmetteurs, il peut être libéré dans la fente synaptique pour aller se fixer dans à des récepteurs post synaptique. Il existe différents types de récepteurs au glutamate : les récepteurs métabotropiques (récepteurs couplés à une protéine G) et les récepteurs ionotropiques.

Ces derniers sont sensibles au N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Ce sont des récepteurs perméables aux ions (canal ionique) et il existe de nombreux isoformes de ces récepteurs régulant leur perméabilité au calcium, potassium et sodium. Lors de la fixation du glutamate sur son site de liaison et en présence de glycine (acide aminé), il y a une activation du récepteur NMDA comme illustré dans la Figure 8. Cela provoque une dépolarisation de la membrane neuronale post synaptique et un relargage d'un ion magnésium. Cet ion de magnésium obstrue l'entrée du pore du récepteur NMDA quand celui-ci est au repos, le rendant imperméable aux autres ions. Ce relargage de magnésium entraîne un influx cellulaire d'ions à travers la protéine canal, comme les ions calciques. Ces ions sont responsables en partie de l'excitabilité neuronale et participent directement à la plasticité neuronale.

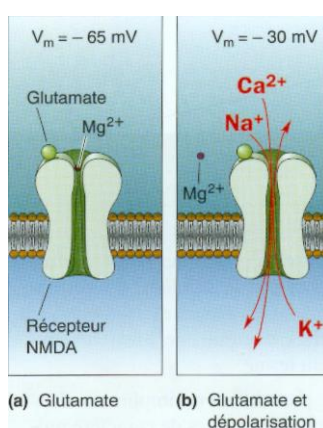


Figure 8 : Récepteur NMDA au repos (a) et sous sa forme activée (b).

Dans la MA il existe une surstimulation des récepteurs à glutamate entraînant une dysfonction de la transmission neuronale pouvant entraîner la mort cellulaire par une entrée massive de calcium dans le compartiment intracellulaire des neurones. Ce phénomène de mort neuronale est décrit sous le nom d'excitotoxicité (71). Il a été décrit dans d'autres pathologies telles que les situations d'ischémie tissulaire (72). Il sera développé par ailleurs un traitement de la MA qui est capable de moduler cette activité glutamatergique.

6. Traitements de la maladie d'Alzheimer

Le développement des molécules d'intérêt thérapeutique pour traiter la MA n'a été au cours de l'histoire que le reflet de l'avancée de ces recherches scientifiques. C'est pour cela qu'une des premières thérapies développées pour la MA repose sur un traitement symptomatique. Le rationnel scientifique sous-jacent à ces premières thérapies repose sur l'hypothèse cholinergique qui a conduit aux inhibiteurs des cholinestérases (iChE) et les antagonistes du récepteur NMDA.

6.1. Inhibiteurs de l'AChE et de la BuChE

La mise en évidence de cette hypothèse cholinergique pour la MA est à l'origine de la seule stratégie pharmacologique / thérapeutique utilisée, qui consiste en l'utilisation de traitements IChE. La transmission cholinergique neuronale dépend de l'hydrolyse rapide de l'ACh par les cholinestérases. Le cerveau humain contient 2 cholinestérases majeures : l'AChE et la BuChE (73). Il semblerait que l'AChE soit la plus abondante des 2 cholinestérases dans le cerveau (74). Elle permet la dégradation de l'ACh par hydrolyse de celle-ci au niveau de la fente synaptique, produisant ainsi de l'acide acétique et de la choline (75,76). La BuChE peut de la même façon que l'AChE, dégrader l'ACh mais avec une spécificité, une cinétique enzymatique, une expression et une activité dans les diverses régions du SNC différentes. De plus il semblerait que l'AChE et BuChE pourraient avoir des rôles autres que les fonctions estérases «classiques» dans la terminaison de la neurotransmission médiée par ACh (modulation du débit sanguin cérébral régional, de la phosphorylation de la protéine *tau* et de la cascade amyloïde qui peuvent affecter la progression de la MA) (77). Les stades avancés de la MA sont caractérisés par une diminution de l'expression de l'AChE dans le SNC du fait de la neurodégénérescence, avec cependant le maintien ou l'augmentation progressive des niveaux de la BuChE cérébrale (5). En conséquence, l'inhibition sélective ou non de la BuChE, si elle intervient au niveau central, semble présenter un intérêt thérapeutique dans les stades avancés de la MA (6,7).

Les molécules composant les spécialités actuellement sur le marché visent essentiellement à restaurer la neurotransmission cholinergique en inhibant au niveau du SNC dans les fentes synaptiques, l'activité de l'AChE. Toutefois, pour observer un effet thérapeutique, il est indispensable que le patient possède un nombre de neurones présynaptiques fonctionnels encore satisfaisant. De fait, l'indication thérapeutique des inhibiteurs de l'AChE est réservée aux formes légères à modérées de la MA (7,78). Des inhibiteurs irréversibles de l'AChE existent (composés organophosphorés comme le gaz Sarin) mais ne disposent pas d'AMM. Dans les molécules inhibitrices de l'AChE, il existe la tacrine. Elle fut commercialisée en France sous la marque Cognex®. C'est un inhibiteur non compétitif réversible de l'AChE mais aussi de la BuChE. Elle fut le premier traitement approuvé par les autorités de santé pour le traitement de la MA. Elle fut retirée du marché français en 2004 à cause notamment de son hépatotoxicité aigüe (79). Il existe donc actuellement 3 inhibiteurs de l'ACh ayant une AMM sur le marché.

6.1.1. Donépézil (Aricept®)

Le Donépézil dont la formule est illustrée dans la Figure 9 est le principal inhibiteur réversible spécifique de l'AChE cérébrale utilisé dans la MA. La posologie de ce traitement est de 5 mg/j pendant un mois puis peut être majorée à 10 mg/j selon la symptomatologie du patient. Il existe sous la forme de comprimés solides ou orodispersibles de 5 et 10 mg. La forme orodispersible permet une meilleure observation du traitement chez les personnes âgées ou présentant des troubles de la déglutition. Son administration doit être faite préférentiellement le soir au coucher afin d'éviter l'apparition de vertiges, effet indésirable important du Donépézil.

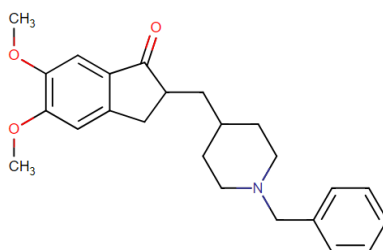


Figure 9: Structure chimique du Donépézil, d'après www.drugbank.ca.

6.1.2. Galantamine (Reminyl®)

Le Galantamine dont la formule est illustrée dans la Figure 10, est un alcaloïde qui présente des propriétés d'inhibiteur spécifique, compétitif et réversible de l'AChE cérébrale. Ce médicament présente aussi la capacité de se lier aux récepteurs nicotiniques et de potentialiser l'action de l'ACh sur ces récepteurs. L'initiation du traitement doit être de 8 mg/j pendant 4 semaines. La posologie pourra ensuite augmentée en palier sous réserve de tolérance (essentiellement digestive) avec 16 mg/j puis au besoin 24 mg/j. L'administration doit être réalisée avec de la nourriture, de préférence au petit déjeuner.

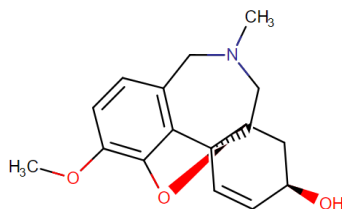


Figure 10: Structure chimique du Galantamine, d'après www.drugbank.ca.

6.1.3. Rivastigmine (Exelon®)

La Rivastigmine dont la formule est illustrée dans la Figure 11 est un carbamate capable d'une double inhibition de l'ACHé et de la BuChE. La Rivastigmine agit par liaison covalente en formant un complexe qui entraîne une inactivation transitoire de ces enzymes. Cette molécule est disponible sous forme de gélule, de solution buvable et de dispositif transdermique (patch). L'initiation du traitement pour les formes orales doit être réalisée à 1,5 mg matin et soir. La posologie peut être augmentée par palier de 6 puis 9 mg avec une dose max à 12 mg/j. Concernant l'administration de Rivastigmine par voie cutanée, la dose initiale est de 4,6 mg/24h. Elle peut être augmentée à 9,5 mg/24h. Il semblerait que la Rivastigmine ne soit pas métabolisée par le cytochrome P450, ce qui en ferait un médicament de choix chez les patients ayant des traitements autres que ceux indiqués dans la MA et métabolisés par ce cytochrome.

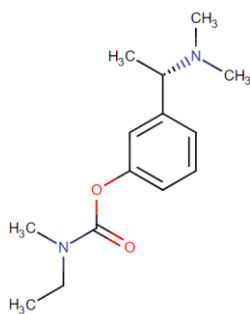


Figure 11: Structure chimique de la Rivastigmine, d'après www.drugbank.ca.

6.1.4. Prescription et effets indésirables

Chacun de ces traitements doit être initialement prescrit par certains médecins spécialistes (neurologue, gériatre, psychiatre) et leur prescription peut être renouvelée par le médecin traitant pour une durée d'un an, faute de quoi le traitement devra être réévalué. Cette prescription initiale doit être réalisée après une évaluation des antécédents du patient (troubles cardiaques, pulmonaires, neurologiques). Certaines pathologies respiratoires (asthme, bronchopneumopathie chronique obstructive) et cardiaques comme la présence d'un bloc auriculo ventriculaire peuvent déconseiller l'utilisation de ces médicaments. La réalisation d'un électro cardiogramme (ECG) est recommandée chez les patients avant toute initiation d'un de ces traitements. Les effets indésirables les plus fréquemment retrouvés sont d'ordre digestif (nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales), cardiaque (bradycardie, troubles de la conduction) et neurologique (sensation de fatigue, vertiges, insomnies). L'augmentation des doses par paliers progressifs pour chacun de ces traitements doit permettre d'évaluer la tolérance des patients.

6.1.5. Surveillance et interactions médicamenteuses

Comme nous l'avons vu, ces traitements de par leur action cholinomimétique, peuvent présenter une importante toxicité cardiaque et doivent donc chez certains patients être administrés en lien avec une surveillance cardiologique étroite. Il existe de nombreuses interactions médicamenteuses liées à l'utilisation de ces traitements :

- Traitements cholinergiques : antidépresseurs tricycliques ou imipraminiques, neuroleptiques phénothiazidiques qui peuvent majorer la toxicité cardiaque des inhibiteurs de l'AChE (majoration d'une hypotension orthostatique). Dans l'état actuel des connaissances, on peut supposer que les effets cardiovasculaires des IChE sont principalement dus à leur action sur le système parasympathique. Parmi les effets cardiaques les mieux connus, il existe l'effet cardio-inhibiteur, c'est-à-dire un ralentissement de la fréquence cardiaque par les IChE et deuxièmement, une augmentation par les IChE de la pression artérielle à travers les sous-types centraux de récepteurs muscariniques M1 et M2 (80).

- Traitements atropiniques : naturellement compétiteurs vis-à-vis des inhibiteurs de l'AChE puisqu'ils visent à antagoniser l'action de l'ACh sur les récepteurs muscariniques centraux et/ou périphériques.

- Inducteurs / inhibiteurs enzymatiques du cytochrome P450 qui peuvent induire un sur/sous dosage d'un des deux traitements.

6.2. Antagonistes des récepteurs NMDA : Mémantine (Ebixa®)

Une seule molécule dispose d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour les stades modérés à sévère de la MA, mais n'a cependant pas d'indication au stade léger, la Mémantine. La Mémantine dont la formule est illustrée dans la Figure 12, est un cyclohexane lipophile avec une biodisponibilité de 100 % et un excellent tropisme neurologique central.

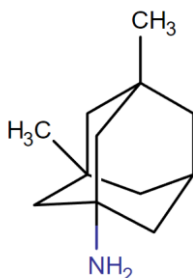


Figure 12: Structure chimique de la Mémantine, d'après www.drugbank.ca.

La Mémantine est un antagoniste non compétitif du récepteur NMDA permettant d'inhiber la suractivité glutamatergique par son action modulatrice. La faible affinité de la Mémantine et le caractère voltage dépendant de sa liaison au récepteur NMDA permettent, aux doses thérapeutiques, d'obtenir une inhibition de 50 % de ces récepteurs. Comme illustré dans la Figure 13, lorsqu'un neurone est au repos (absence d'une dépolarisation membranaire), la Mémantine se fixe au récepteur NMDA et empêche l'activation de ce dernier par le NMDA. Cela permet d'éviter l'entrée anarchique de calcium dans le neurone post synaptique (phénomène responsable de l'excitotoxicité). Lorsque le neurone est activé via une dépolarisation membranaire, la Mémantine se délie du récepteur NMDA permettant l'entrée contrôlée de calcium dans le compartiment intra cellulaire du neurone post synaptique. Cette régulation de l'entrée du calcium dans le compartiment intracellulaire permet de préserver la fonction physiologique des récepteurs NMDA malgré les concentrations importantes de glutamate dans la fente synaptique.

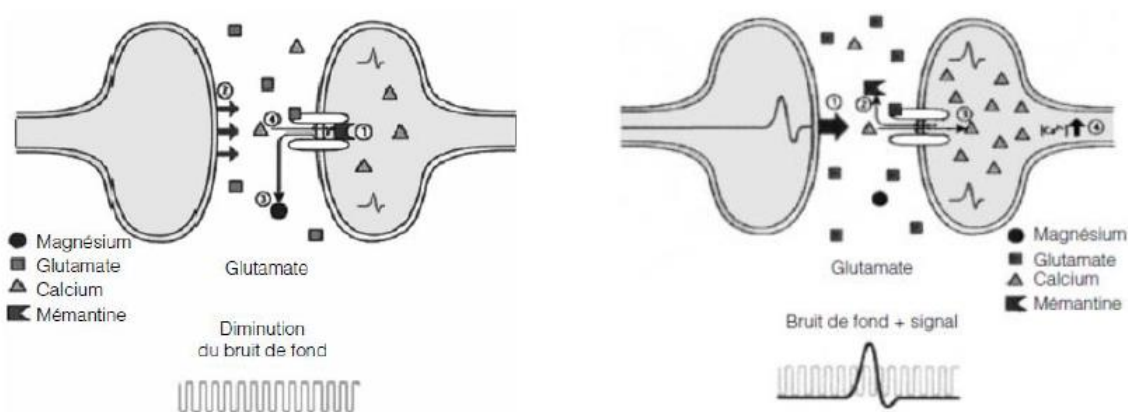


Figure 13: Mécanisme d'action de la Mémantine (81).

La Mémantine est disponible sous forme de comprimé ou de solution buvable. La dose efficace recherchée est de 20 mg/j en une seule prise. La dose initiale doit être de 5 mg/j et peut être augmentée chaque semaine de 5 mg/j. Le profil de tolérance de la Mémantine est semblable à celui des inhibiteurs de l'AchE. Il est principalement retrouvé chez certains patients des troubles digestifs (constipation, vomissements, pancréatite), neurologiques et cardiaques (hypertension artérielle) imposant donc une augmentation par palier et la recherche d'une dose efficace minimale. Certains traitements comme les diurétiques ou les inhibiteurs de l'enzyme de conversion peuvent interférer avec l'élimination rénale de la Mémantine et provoquer un surdosage significatif et une augmentation de la fréquence de survenue des effets indésirables. De même que chez les personnes présentant une insuffisance rénale chronique, la posologie de la Mémantine devra être adaptée.

6.3. Intérêt dans le traitement de la maladie d'Alzheimer

Aucune étude n'a montré la supériorité d'un de ces traitements sur un autre. L'utilisation de tels traitements ne parvient à améliorer les fonctions cognitives que chez 10 % des patients traités, tout en permettant de retarder l'évolution de la MA de 6 mois (82). Néanmoins ces molécules ne permettent pas d'obtenir une guérison complète de la MA, n'assurant qu'un temps le maintien de la transmission cholinergique dans le SNC. On peut donc parler de traitement symptomatique. A ce jour il n'existe encore aucun traitement curatif de la MA. La destruction du réseau neuronal par l'accumulation de plaques amyloïdes et de DNF ne permet plus d'avoir au cours du temps un réseau de neurones présynaptiques fonctionnels et entraîne donc les patients en situation d'échappement thérapeutique. Cet état se caractérise comme un ralentissement de l'effet thérapeutique du traitement au cours du temps, dans ce cas dû à la perte synaptique et l'atrophie cérébrale consécutive à la destruction neuronale.

6.4. Perspectives thérapeutiques

Différentes pistes de recherche de nouvelles molécules actives d'un point de vue curatif existent. La recherche se développe autour des propriétés d'action dites pléiotropes d'un composé, c'est-à-dire sa capacité à viser plusieurs cibles impliquées dans la MA. Ces molécules sont regroupées sous le nom de ou encore *Multi-Target Directed Ligands* (MTDLs) et divers d'entre elles sont regroupées en fonction de leur action intra et extra cellulaire (Figure 14). A titre d'exemple, il a été développé des ligands multifonctionnels capable d'inhiber sélectivement la BuChE humaine et une bonne activité antioxydante (83) ou bien encore des composés capables d'inhiber à la fois les cholinestérases humaines (AChE et BuChE) et les monoamines oxydases (MAO), enzymes dégradant aussi bien la sérotonine, que la dopamine et la noradrénaline (neuromédiateurs) (84).

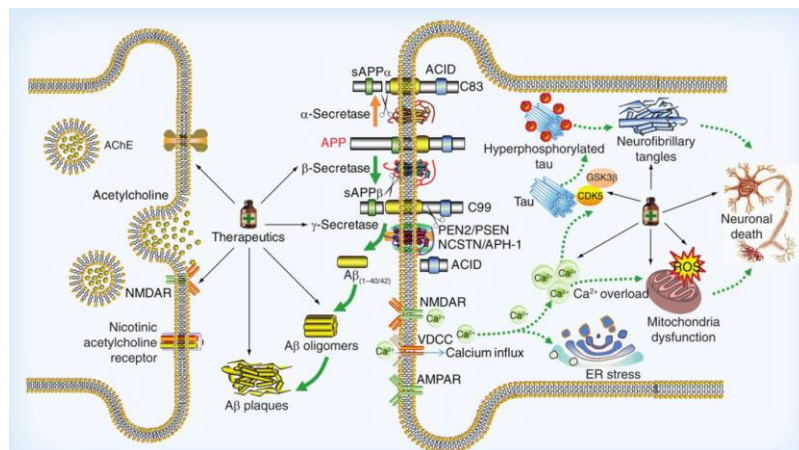


Figure 14 : Schéma représentatif des voies physiopathologiques de la MA ainsi que les causes moléculaires et les cibles pharmacologiques aujourd'hui au centre de la recherche dans le but de modifier son évolution (85).

B. Propriétés et administration de la molécule d'intérêt dans le cadre de ce travail de thèse

1. Molécule d'intérêt

Les stades avancés de la MA sont caractérisés par une diminution de l'expression de l'AChE dans le SNC du fait de la neurodégénérescence, avec cependant le maintien ou l'augmentation progressive des niveaux de la BuChE cérébrale (5). Or, la BuChE dégrade physiologiquement l'ACh, comme l'AChE, avec cependant des différences dans leur cinétiques de dégradation, de localisation et d'expression tissulaire. Les neurones positifs à la BuChE se projettent spécifiquement sur le cortex frontal et peuvent avoir des rôles dans l'attention, la fonction exécutive, la mémoire émotionnelle et le comportement (77). Il a été démontré que l'inhibition sélective de BuChE élève les concentrations extracellulaires d'ACh (86). Il a aussi été montré que des souris sans activité AChE sont non seulement capables de survivre, mais aussi de développer une intégrité structurelle et fonctionnelle des voies cholinergiques centrales et périphériques, ce qui indique que BuChE est capable de compenser certaines fonctions de l'AChE (74). En conséquence, l'inhibition sélective de la BuChE, si elle intervient au niveau central, semble présenter un intérêt thérapeutique dans les stades avancés de la MA (6,7).

Parmi les inhibiteurs d'AChE commercialisés, seule la Rivastigmine inhibe de façon conjointe l'AChE et la BuChE mais aucun inhibiteur spécifique de la BuChE n'a été approuvé à ce jour pour le traitement de la MA (78). Le PA qui fait l'objet de la présente étude est une molécule faisant déjà l'objet d'une AMM pour une maladie autre que la MA. C'est une prodrogue (ester) agissant sur le système β 2-adrénérique. Or, les agonistes β 2-adrénériques capables d'exercer leur effet au niveau central, peuvent présenter un intérêt dans le traitement de la MA à travers une promotion de la plasticité synaptique et une réduction de l'agrégation amyloïde (87) en permettant de palier à l'absence d'ACh (Figure 15).

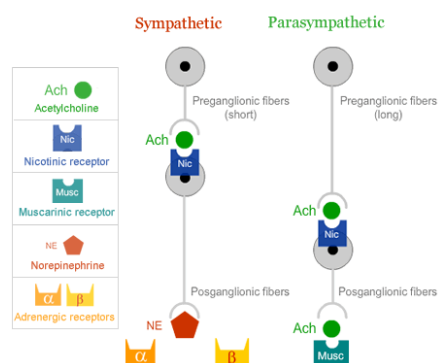


Figure 15 : Interaction entre récepteurs nicotiniques pré synaptiques et récepteurs adrénériques post synaptiques (88).

De plus, l'ester que nous souhaitons étudier libère après le clivage de ses groupements carbamates par la BuChE, un second composé lui-même agoniste sélectif β 2-adrénérique. Ce composé est susceptible d'inhiber de façon covalente et pseudo-irréversible cette enzyme et pourrait constituer un PA pléiotrope d'intérêt symptomatique et curatif dans la MA. Le mécanisme d'action du PA d'intérêt est illustré en Figure 16.

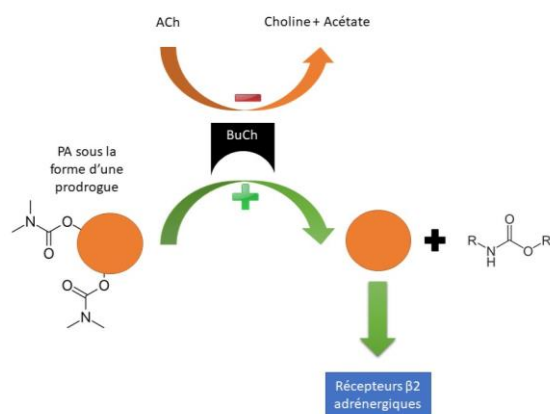


Figure 16 : Schéma du mécanisme d'action du PA d'intérêt.

Pour ce faire, il doit exercer ses activités au niveau central pour ne pas risquer de générer des effets secondaires importants, en particulier au niveau cardiaque. Cependant, son caractère hydrophile ($\log D_{7,4} = -0,7$ et $\log S = -2,9$ d'après Drugbank et MarvinSketch 16.8.15) risque de le rendre inapte à traverser la BHE après administration orale ou intraveineuse. Des voies d'administration telles que la voie intrathécale, permettent d'acheminer le PA directement dans le cerveau mais elles sont très invasives (89). Il est donc nécessaire de pouvoir développer de nouvelles voies d'administration permettant de délivrer des PA incapables de franchir naturellement la BHE.

2. Voie intranasale

2.1. Fonctions de la voie nasale

La cavité nasale possède un rôle principal de ventilation et de protection de l'organisme des éléments nocifs apportés par cette ventilation. Elle permet le réchauffement et l'humidification de l'air qui sera inhalé avant que ce dernier n'atteigne les voies respiratoires profondes. Elle possède aussi des fonctions ventilatoires et sécrétoires, ainsi qu'une fonction sensorielle olfactive (90,91).

2.2. Anatomie et physiologie de la voie intranasale

L'anatomie de la voie nasale, illustrée en Figure 17 fait partie intégrante de l'anatomie des voies aériennes supérieures (nez, fosses nasales, bouches, pharynx et larynx). Les fosses nasales sont constituées par deux couloirs aériens creusés dans l'os maxillaire, ouverts vers l'extérieur au niveau des narines et se prolongeant dans le rhinopharynx. Ces fosses nasales sont séparées par la cloison nasale qui est une paroi cartilagineuse. Chez l'adulte, le volume des fosses nasales est d'environ 15 mL et représentent une surface de 150 cm².

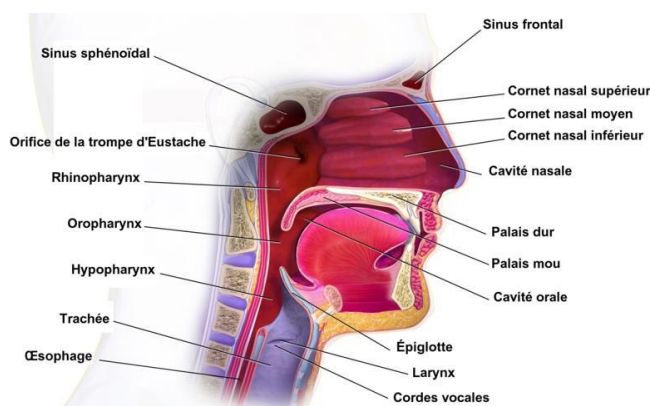


Figure 17 : Anatomie des voies aériennes supérieures [92].

L'intérieur de ces fosses nasales est tapissé par de la muqueuse nasale. Cette muqueuse est composée d'un épithélium de type respiratoire comprenant des cellules ciliées et caliciformes, cellules productrices de mucus. Il existe un grand réseau de vascularisation dans la sous-muqueuse propice à l'absorption de PA et peut être séparée en trois régions fonctionnelles distinctes : au féminin

- Région vestibulaire : elle est située à l'entrée des narines et recouverte d'un épithélium de type épidermoïde (pavimenteux pluristratifié et non kératinisé). Sa surface représente en moyenne 15 cm². Elle permet la filtration de grosses particules inhalées, retenues par la présence de poils nasaux.

- Région respiratoire : c'est la région la plus importante de la cavité nasale (130 cm²). Elle est constituée d'un épithélium cylindrique à cellules ciliées, mucipares et basales. Cette muqueuse repose sur trois cornets (inférieur, moyen et supérieur). Ce sont des structures osseuses courbes de soutien de la cavité nasale. Cette région est responsable de l'humidification et de la régulation de l'air inhalé.

- Région olfactive : cette zone est le siège de l'olfaction. Elle est réduite à la partie moyenne supérieure de la voute nasale et représente une superficie de 10 à 20 cm². La muqueuse olfactive, visible dans la Figure 18 est constituée dans son chorion de glandes tubulo-acineuses de Bowman, qui sont les principales cellules productrices de mucus. La

muqueuse superficielle est composée de cellules de soutien, de cellules basales et de cellules de Schultze. Ces dernières sont des cellules nerveuses sensorielles dont l'un des prolongements se termine en un renflement couvert de cils olfactifs non mobiles à la surface de la muqueuse. A leur extrémité interne il existe un second renflement qui forme avec la réunion d'autres axones de cellules sensorielles, un prolongement vers le nerf olfactif (premier nerf crânien). Ces fibres nerveuses traversent la lame criblée de l'os ethmoïde pour rejoindre le bulbe olfactif, logé sous le lobe frontal des hémisphères cérébraux. Ensuite des fibres nerveuses relayent le bulbe olfactif pour rejoindre les centres cérébraux de l'olfaction (temporaux).

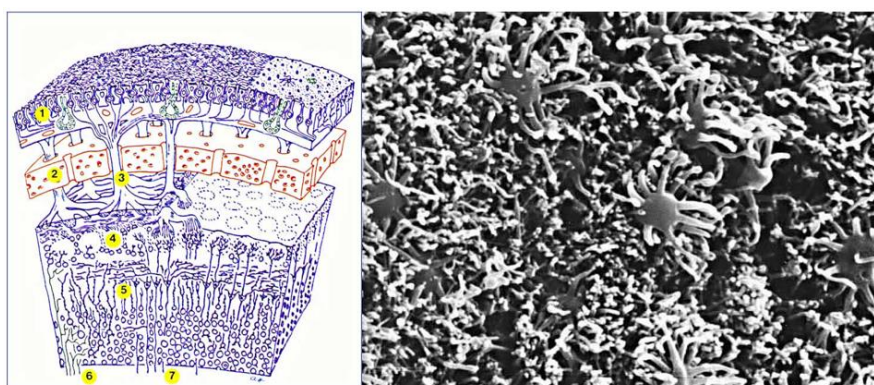


Figure 18 : Système olfactif en dessin et vue en microscopie électronique de la surface de la muqueuse olfactive, d'après www.cnrs.fr.

Document CNRS - Université Claude Bernard, dessin A. Holley et cliché F. Jourdan & CMEABG. Avec en légende des récepteurs olfactifs (1), la lame osseuse (2), les filets du nerf olfactif (3), les glomérules (4), les cellules mitrales (5), les fibres nerveuses centrifuges (6) et le nerf olfactif (7), Echelle 1 U = 1 micromètre.

2.3. Mécanismes d'absorption

L'absorption de molécules par la muqueuse nasale est bien connue et est utilisée pour de nombreux médicaments ayant une action thérapeutique soit locale (décongestionnant), mais également pour une action systémique (vaccination, calcitonine, sumatriptan, ...). En fonction de la voie d'accès, le PA peut atteindre le bulbe olfactif par absorption intraneuronale et à partir de là entrer dans les régions du cerveau reliées au tractus olfactif (réseau piriforme) puis vers le cortex, l'hypothalamus, ou l'amygdale). Le PA peut ensuite disséminer à travers le SNC. Le PA peut aussi diffuser directement à partir du LCR dans l'ensemble du SNC par le biais de la muqueuse olfactive ou en s'intégrant dans le réseau nerveux trigéminé (Figure 19). Physiologiquement après l'administration de PA dans la cavité nasale, le transport du PA au niveau de l'épithélium olfactif peut être réalisé par transport axonal après internalisation dans les neurones, ou par transport paracellulaire (espaces entre les cellules), ou par transport extra neuronal (à travers les canaux à proximité des nerfs olfactifs) ou par transport transcellulaire (Figure 20). La première étude décrivant la

délivrance directe d'une protéine au cerveau par la voie nerveuse olfactive a été publiée par Frey et al. en 1995 (93). Cette affirmation était fondée sur l'accumulation observée d'un facteur de croissance nerveux radiomarké dans le bulbe olfactif peu après son administration intranasale chez le rat.

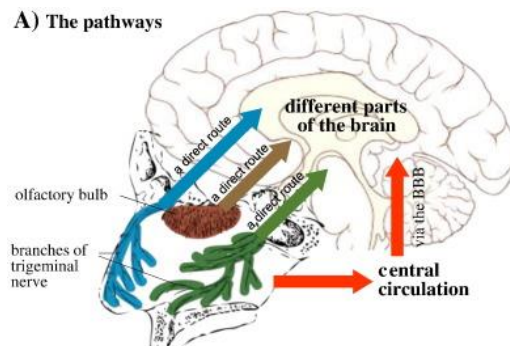


Figure 19 : Voies d'accès des principes actifs (PA) au SNC via une administration dans la cavité nasale d'après (94).

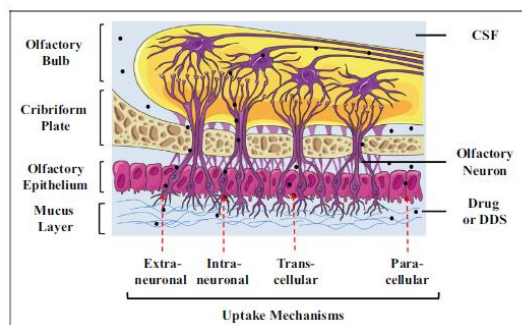


Figure 20 : Schéma de la voie olfactive et les possibles voies de diffusion d'un PA vers le SNC, d'après Samaridou et al. (95).

2.3.1. Mucus et principe actif

Une première étape pour permettre l'absorption de médicament par voie nasale est la diffusion du PA au travers de la couche de mucus. Le mucus nasal est composé d'eau à 95 %, ce qui lui permet d'exercer le rôle d'humidificateur de l'air inhalé que nous avons exprimé précédemment, en plus de son rôle immunitaire. Cette couche de mucus constitue une barrière physique protectrice de la muqueuse vis-à-vis des agents pathogènes, des toxines et autres substances potentiellement nocives (96). De plus le transport et la diffusion de PA seront affectés par les propriétés de surface et de structure du mucus nasal, une élimination mucociliaire, mais aussi des enzymes métaboliques qui sont présentes dans la muqueuse olfactive des mammifères (cytochrome P450, estérases et transférases) (97,98).

2.3.2. Mucines

Un des principaux composants du mucus nasal, mais aussi pulmonaire et digestif, est la mucine (5% de la composition totale). Les mucines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire (250 – 30 000 kDa) constituées d'une chaîne peptidique centrale (apomucine) liée à de chaînes glucidiques par des liaisons O et N-glycosidiques (99). La structure de la mucine est représentée dans la Figure 21.

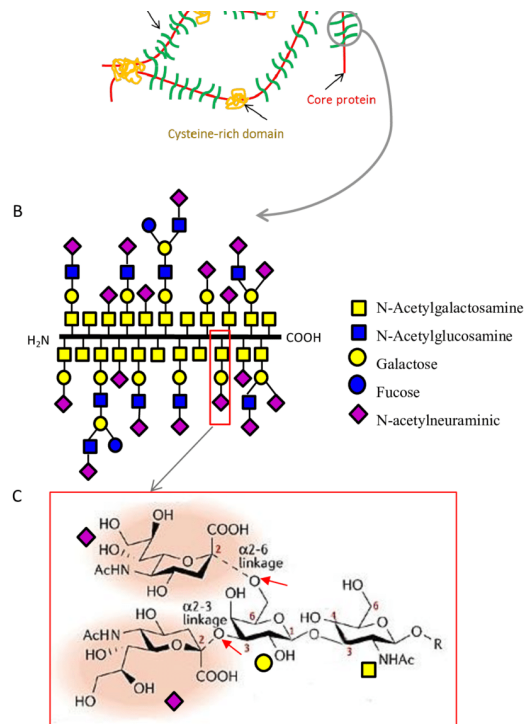


Figure 21: Structure moléculaire de la mucine nasale. (100)

La mucine est sécrétée de manière continue par les cellules caliciformes de la muqueuse olfactive. Il existe différentes couches de mucus superposées, dépendant directement des concentrations en mucine et en eau présentes : le mucus profond ou péri-ciliaire (solide et non labile) et le mucus superficiel (sous forme de gel visqueux). La concentration en mucine ainsi que la teneur en eau du mucus permettent de déterminer les propriétés d'adhérence et de diffusion dans le mucus de particules solides et de produits chimiques volatiles présents à sa surface. La diffusion de molécules au travers de cette couche de mucus de PA dépendra donc essentiellement des propriétés physico-chimiques de ce dernier. Cette diffusion sera d'autant plus aisée que le PA sera de faible poids moléculaire et peu ionisé (diminution des interactions avec la mucine).

2.3.3. Drainage mucociliaire

L'élimination de la couche superficielle de mucus (couche labile) est régulée par l'action de cils mobiles, ce mécanisme est connu sous le nom de *drainage mucociliaire*. Ce drainage permet donc l'élimination des substances emprisonnées dans le mucus vers le pharynx, c'est le principal mécanisme de défense et d'épuration de la voie nasale. La vitesse de ce drainage est en moyenne de 5 mm/min dans la cavité nasale et dépend ensuite de la zone anatomique de l'arbre respiratoire où le mucus se situe : 10 – 24 mm/min dans la trachée puis 0,5 – 2 mm/min dans les bronchioles (101). Ce drainage mucociliaire est donc dépendant localement du diamètre des voies respiratoires mais aussi de l'action des cils vibratiles. Ce drainage mucociliaire peut être influencé par l'humidité et la température de l'air inhalé ainsi que la présence de molécules ou d'agents pharmacologiques. Le drainage est aussi particulièrement impacté lorsque l'individu souffre d'un état pathologique comme une infection des voies respiratoires (entraînant une diminution du drainage mucociliaire par une modification du mucus due à un état inflammatoire et favorisant ainsi le développement de l'infection par un manque d'élimination des organismes pathogènes), un état tabagique, la présence d'un traumatisme ou encore d'allergie. L'intensité du drainage mucociliaire combinée à la propension des molécules d'intérêt thérapeutique à adhérer et diffuser à travers le mucus définissent principalement la clairance (élimination) nasale d'un PA.

2.3.4. Facteurs influençant l'absorption nasale

Divers processus biologiques présents au niveau de la muqueuse nasale peuvent influencer l'administration et l'absorption de PA à travers la muqueuse nasale :

- Facteurs physiologiques :

- La présence d'enzymes naturellement présentes dans le mucus et les sécrétions nasales pouvant interférer pouvant modifier / dégrader les PA.
- La clairance mucociliaire qui va interférer avec la clairance nasale des PA.
- La composition qualitative et quantitative (volume, viscosité, vitesse de sécrétion) des sécrétions nasales.

- Facteurs liés au PA :

- Pour pouvoir être absorbé à travers la membrane nasale, et d'une façon plus générale à travers toutes les barrières biologiques de l'organisme, le PA doit présenter certaines caractéristiques physico-chimiques intrinsèques. Lipinski *et al.* ont énoncé un ensemble de règles (*Rule of five*) (102), complétées par Veber *et al.*

(103), qui permettent de déterminer si une molécule sera peu ou pas absorbée au niveau de l'intestin (et plus généralement à travers toute membrane cellulaire) :

- ✓ Un poids moléculaire > 500 Da
- ✓ Une molécule comportant plus de 5 donneurs de liaison hydrogène
- ✓ Une molécule comportant plus de 10 accepteurs de liaison hydrogène
- ✓ Une valeur de log P >5 (caractère hydrophobe)
- ✓ Un nombre de liaisons à libre de rotation > 10
- ✓ Une surface polaire > 140 Å²

- Facteurs liés à la formulation galénique :

- Avoir une administration sous forme de gel ou de solution permettant de s'adapter et diffuser au mieux à travers les microvillosités de la muqueuse nasale.
- Avoir un pH adapté au milieu nasal (pH physiologique entre 5,5 et 6,5 chez l'adulte)
- Avoir une iso osmolarité de la formulation vis-à-vis du mucus nasal
- Avoir des propriétés rhéologiques satisfaisantes (viscosité et muco-adhérence) pour pouvoir interagir avec la mucine, diminuer la clairance nasale du PA et ainsi augmenter son temps de résidence au niveau de la cavité nasale (8).

2.4. Avantages et inconvénients de la voie intranasale

La voie intranasale est une voie d'administration très peu invasive, indolore et utilisable en ambulatoire car facilement accessible. Cette voie permet de court-circuiter la BHE puisqu'un PA administré dans la cavité intranasale peut atteindre directement le SNC. Elle bénéficie d'une rapidité d'action du PA après administration tout en évitant un effet de premier passage hépatique en cas de dissémination systémique. Elle est généralement associée à une bonne observance de traitement. Il existe aussi des inconvénients spécifiques à cette voie d'administration avec la présence d'enzymes spécifiques capables de dégrader les PA, la présence d'effets indésirables locaux spécifiques à l'action des PA sur la muqueuse nasale, l'administration d'un volume restreint de formulation et d'une surface restreinte d'absorption pouvant imposer certaines concentrations élevées en PA.

2.5. Formes pharmaceutiques adaptées à la voie nasale

Il existe différentes formes galéniques administrables par voie nasale dont les propriétés et process de fabrication doivent respecter les définitions et règles énoncées dans la Pharmacopée Européenne (104,105). Selon celle-ci les préparations nasales se définissent comme des « Préparations liquides, semi-solides ou solides destinées à l'administration dans les cavités nasales en vue d'une action locale ou systémique ». Ces

préparations peuvent contenir une ou plusieurs substances actives. Ces préparations peuvent contenir « des excipients destinés, par exemple, à ajuster la viscosité de la préparation, à adapter ou stabiliser le pH, à augmenter la solubilité de la ou des substances actives ou à stabiliser la préparation ». Éléments importants, les préparations nasales doivent être, dans la mesure du possible, isotoniques, non irritantes et n'exerçant aucun effet notable sur les fonctions de la muqueuse nasale et de ses cils. Ces recommandations sont donc primordiales et feront l'objet dans le cadre de ce travail, d'un cahier des charges pour l'élaboration d'une formulation adaptée à une administration intranasale en termes d'osmolarité (300 ± 20 mOsmol), de pH (6 ± 3) et de viscosité (12 ± 2) afin d'éviter toute toxicité locale (105,106). De même, lors de la fabrication de préparations nasales contenant des particules en dispersion, des mesures doivent être prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et appropriée à l'usage prévu. Ces préparations peuvent ou non être stériles ; les contrôles microbiologiques étant différents selon le statut de la préparation.

Il existe ainsi plusieurs catégories de préparations nasales : les préparations liquides pour instillation ou pulvérisation nasale, les poudres nasales, les préparations nasales semi-solides, les solutions pour lavage nasal et les bâtons pour usage nasal. Les préparations liquides pour pulvérisation nasale doivent aussi satisfaire aux exigences de la monographie des « Préparations pharmaceutiques pressurisées » (chapitre 0.5.23) et que la taille des gouttelettes pulvérisées est « telle que leur dépôt se localise dans la cavité nasale ». La taille des gouttelettes influant sur leur distribution, plus la taille diminue et plus les gouttelettes iront profondément dans l'arbre respiratoire. Si les gouttelettes se dispersent après la cavité nasale, l'administration des molécules est majoritairement pulmonaire. Les règles de préparation des formulations doivent dans ce cas se référer au chapitre 0.6.71 (« Préparations pour inhalation »). Selon la littérature, le diamètre des gouttelettes doit être $> 50 \mu\text{m}$ pour obtenir un dépôt maximal dans la cavité nasale (107,108). Toutes ces préparations doivent répondre en termes de contrôle aux essais d'uniformité de masse (quantité de formulation/dose) et uniformité de teneur (quantité de PA / formulation).

C. Formes galéniques étudiées dans le cadre de ce travail de thèse

1. Hydrogels

Il existe actuellement sur le marché des formulations galéniques permettant l'administration de PA pour la voie intranasale. Certaines formulations innovantes permettent l'administration de liquides à température ambiante, qui sont donc plus aisés à administrer au niveau de la cavité intranasale, mais qui sont aussi capables de gélifier sous l'effet de la

température corporelle permettant d'augmenter le temps de contact avec la muqueuse visée (109). Ces formulations sont définies comme des hydrogels thermosensibles.

1.1. Définition

Les hydrogels sont constitués d'un réseau tridimensionnel de mailles de polymères reliés entre eux par des liaisons physiques ou chimiques. La réaction d'expansion d'un gel (*ever-growing*) est basée sur la réaction d'un ou plusieurs monomères qui induit une polymérisation (réticulation) en réseau 3D (110). Ce réseau réticulé est capable d'absorber de grandes quantités d'eau ou de fluides biologiques au sein d'une matrice gélifiée (111). En comparaison aux autres matériaux synthétiques, les hydrogels ressemblent, simulent un tissu naturel pour le microenvironnement par leurs propriétés de porosité et de réseau hydraté. Le mécanisme de relargage le plus étudié et le plus connu des PA incorporés dans une matrice d'hydrogel reste la diffusion passive. Historiquement, les premières approches médicales sur les hydrogels remontent aux années 1950 avec les travaux de Wichterle *et al.* pour des applications ophtalmiques puis par Lim *et al.* avec la première synthèse d'hydrogel chimique (112). Depuis, de nombreuses études se concentrent sur le développement de nouvelles formes d'hydrogels ainsi que sur leur structure et leur biocompatibilité (113). De nombreux domaines autres que la santé tels que l'industrie agroalimentaire, l'ingénierie tissulaire et la cosmétologie, travaillent au développement de nouveaux monomères étendant les possibilités de formulation et de ces formes galéniques. Cet intérêt croissant de la communauté scientifique et industrielle est illustré dans la Figure 22.

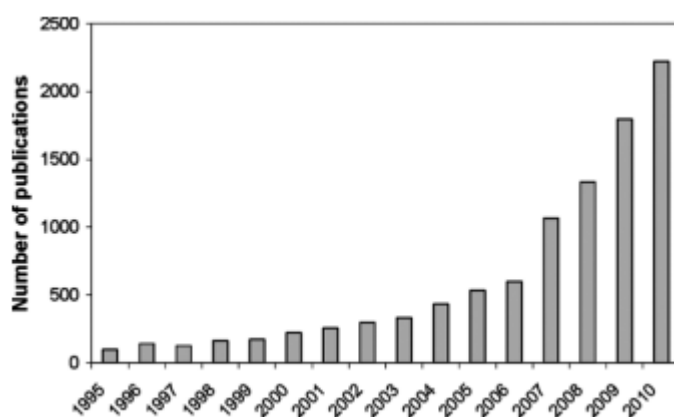


Figure 22 : Nombre de publications relatives aux hydrogels entre 1995 et 2010. (114)

Il existe une classification de ces hydrogels selon différents critères :

- *Source du polymère* : naturel ou synthétique. Les polymères naturels peuvent présenter une immunogénicité et provoquer une réponse inflammatoire par la présence de fonctions immunogènes. Ils présentent aussi l'avantage d'être le plus souvent biocompatibles et non toxiques pour l'organisme.

- *Stabilité* : les hydrogels peuvent être stables chimiquement ou bien se dégrader et se dissoudre (115).

- *Nature de la réticulation* (point d'assemblage polymérique) : certains hydrogels sont dits « réversibles » ou « physiques » quand les liaisons entre les polymères sont de force faible (liaison ionique, interaction d'hydrogène ou hydrophobes). A l'inverse les hydrogels peuvent être « permanents » ou « chimiques » lorsque leur réseau de polymères est lié de manière covalente.

- *Durée de vie dans l'organisme* : dégradable ou non

- *La sensibilité de l'hydrogel aux propriétés physiques* : hydrogel conventionnel ou « intelligent ». Ces hydrogels peuvent réagir à des stimuli extérieurs, entraînant des modifications profondes de leur structure et de leur propriétés physico-chimiques (perméabilité, volume de gonflement, résistance mécanique). Il existe différents types de stimuli qui peuvent être soit de nature chimique ou physique, illustrés dans la Figure 23. Pour permettre d'administrer facilement une préparation par voie intranasale qui formerait un gel *in situ*, dans la cavité nasale, il paraît intéressant de pouvoir formuler un hydrogel dit « intelligent », et plus particulièrement, capable de gélifier à la température spécifique de la muqueuse olfactive, soit 32 - 35 °C (116). A titre d'illustration, certains *stimuli* pouvant intervenir dans la transformation d'un hydrogel « intelligent » sont classés dans la Figure 24.

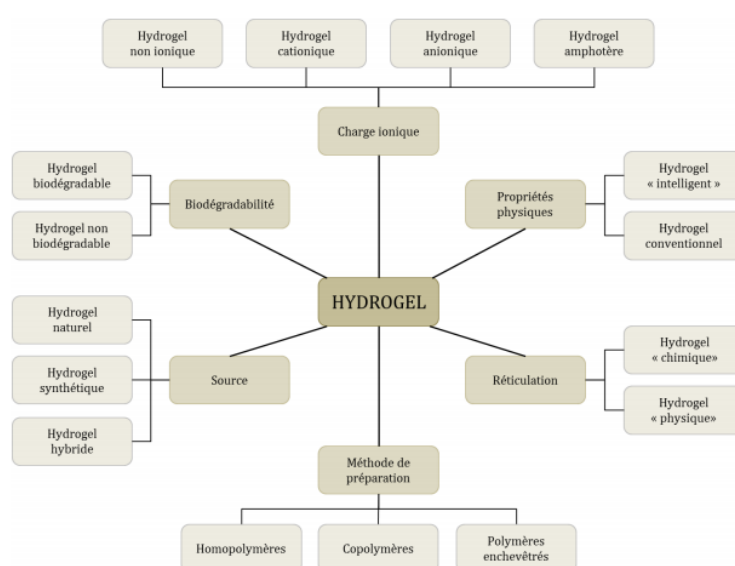


Figure 23 ; Classification des hydrogels inspiré par Patel et al. (117)

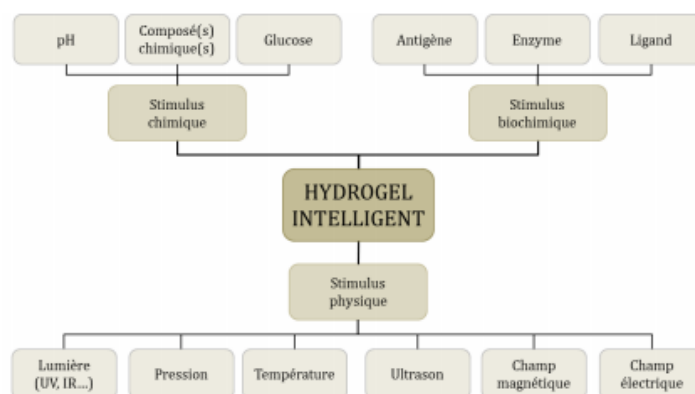


Figure 24 ; Classification des différents types de stimuli pour les hydrogels "intelligents" inspiré par Patel et al. (117)

1.2. Hydrogel de poloxamères

1.2.1. Nature chimique des poloxamères

Certains hydrogels peuvent donc se former *in situ* en réponse à un stimulus externe tel que la température (9). Les hydrogels sensibles à la température les plus étudiés sont des hydrogels synthétiques le plus souvent caractérisés par la présence de groupements hydrophobes (méthyl, éthyl et propyl) dont les principaux types sont regroupés Figure 25 .

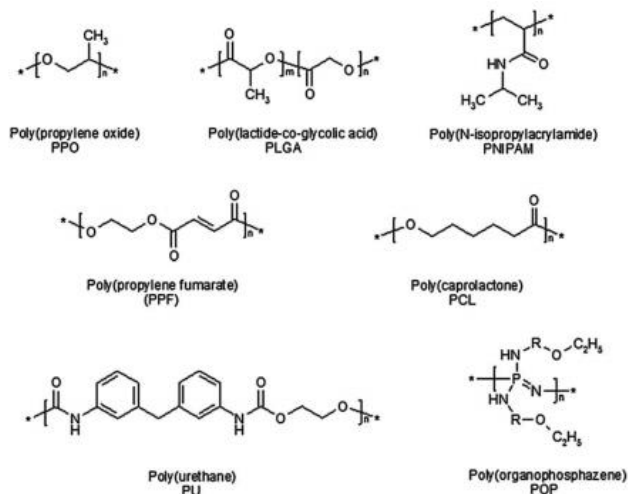


Figure 25 : Exemples de blocs hydrophobes constituant les copolymères entrant dans les formulations d'hydrogels thermosensibles. (118)

De tels gels dits thermosensibles sont des gels capables de se gonfler ou de rétrécir selon la température du solvant environnant. Certains de ces gels thermosensibles sont dits aussi thermoréversibles. Cette catégorie de gels thermosensibles regroupe les formulations où les polymères constituant les gels ne sont pas liés de manière covalente entre eux, ce qui induit une transition d'une phase solution (polymères libres) à une phase de gel (polymères

liés) et inversement, au lieu d'un gonflement – rétrécissement. C'est-à-dire qu'à une température critique, ces hydrogels subissent une transition physique qui les amène d'un état de solution aqueuse vers l'état de gel, notée température de transition solution – gel ($T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$). Ces gels thermosensibles - thermoréversibles, peuvent être formulés à partir de poloxamères. Ils représentent un ensemble de copolymères triblocs. Ils sont composés d'un centre hydrophobe à base de polyoxyde de propylène (PPO) et de deux chaînes latérales identiques hydrophiles de polyoxyde d'éthylène (PEO). Ce sont des agents amphiphiles considérés comme des tensioactifs non ioniques, et qui présentent selon leurs caractéristiques des propriétés dispersantes, émulsifiantes, solubilisantes, détergentes et/ou dispersantes selon Rowe *et al.*, 2005.

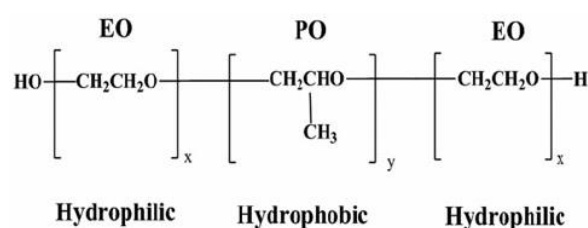


Figure 26 : Formule chimique d'un copolymère de poloxamères. (119)

Il existe de nombreux types de poloxamères, qui se différencient par leur poids moléculaire et le ratio des motifs PPO et PEO présents (Figure 26). Parmi les poloxamères les plus fréquemment rencontrés, on trouve les poloxamères 188 (P188) et 407 (P407) dont les caractéristiques sont indiquées dans le Tableau 1 (120). Les poloxamères permettent l'obtention d'hydrogels transparents, incolores et lavables à l'eau. Ces composés sont réputés comme étant non toxiques, biodégradables et biocompatibles après administration dans l'organisme (121).

Tableau 1 : Différences entre poloxamère 407 (P407) et poloxamère 188 (P188) et caractéristique des poloxamères les plus couramment utilisés (Pharmacopée Européenne 7.0, 2008).

Poloxamères	Etat physique	Nombre de motifs PPO	Nombre de motifs PEO	Poids moléculaire (g/mol)
407	Solide	95 - 105	54 - 60	9840 - 14 600
338	Solide	137 - 146	42 - 47	12700 - 17400
237	Solide	60 - 68	35 - 40	6840 - 8830
188	Solide	75 - 85	25 - 30	7680 - 9510
124	Liquide	10 - 15	18 - 23	2090 - 2360

1.2.2. Gels thermosensibles à base de poloxamères

Dans un hydrogel de poloxamères, la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ est dépendante des conditions thermodynamiques initiales (pression et température) et de la concentration en poloxamères. Dans une formulation de poloxamères à basse température ($T^{\circ} < T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$) les motifs hydrophiles de PEO situés aux extrémités des polymères sont entourés de molécules d'eau (solvatées). L'état physique de la formulation est alors une solution. Au-delà d'une certaine concentration dite « concentration critique micellaire », les molécules de poloxamères interagissent entre elles du fait de la création d'interactions hydrophobes entre les blocs centraux de PPO. Les molécules de poloxamères s'organisent en micelles, c'est-à-dire qu'elles forment des petites vésicules sphériques contenant en leur centre un cœur hydrophobe constitué de PPO, et en périphérie des blocs hydrophiles de PEO solvatés. Ces micelles de poloxamères ont par ailleurs été étudiées pour leur capacité d'encapsulation et de solubilisation de substances hydrophobes dans un milieu aqueux (122). Comme illustré dans la Figure 27, quand la température du milieu augmente et que celle-ci dépasse la température critique de la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$, les micelles sont capables de former un réseau tridimensionnel par désolvatation de leurs blocs hydrophiles. La formation d'un réseau tridimensionnel de micelles de poloxamères crée un gel pouvant stocker de grandes quantités d'eau.

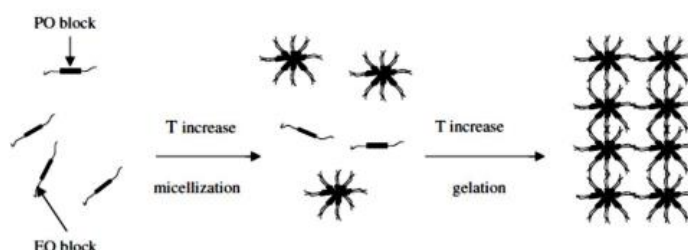


Figure 27 : Mécanisme de gélification du P407 dans l'eau. (123)

Les hydrogels thermoréversibles en tant que système de délivrance de PA présentent de nombreux avantages selon leur état physique (Tableau 2). Il est donc possible d'administrer un hydrogel thermoréversible par voie intranasale sous la forme d'une solution contenant un PA hydrophile et qui sera capable de gélifier à une $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ correspondant à celle de la muqueuse olfactive. L'administration aisée et facilitée de ces préparations pourrait être bénéfique pour les populations pédiatriques et gériatriques avec la possibilité d'un ajustement de dose précis selon le poids du patient. Il est possible de stériliser ces préparations par filtration, pouvant empêcher l'emploi d'antimicrobiens conservateurs.

Tableau 2 : Avantages et perspectives de hydrogels solution - gel.

Etat de solution	Etat de gel
✓ Administration aisée et sécurisée ✓ Ajustement facilité de la dose administrée ✓ Mélange homogène ✓ Possibilité de stérilisation	✓ Maitrise de la cinétique de libération ✓ Possibilité de gélification ciblée <i>in situ</i> ✓ Propriétés de bioadhésion permettant une action locale et prolongée

1.3. Hydrogels mucoadhésifs

1.3.1. Définition de la mucoadhésion

Pour optimiser la rémanence du gel ainsi formé dans la cavité intranasale, il peut être avantageux d'avoir recours à des formes mucoadhésives. Le concept de la mucoadhésion a été introduit dans le domaine des médicaments au début des années 1980 (124). Le terme de bioadhésion est défini comme l'attachement d'un macromolécule naturelle ou synthétique au mucus (mucoadhésion) ou à une surface épithéliale selon Mathiowitz *et al.* Cela traduit la capacité d'un matériau à adhérer à un tissu biologique pour un temps prolongé. Les principales théories expliquant les phénomènes de mucoadhésion reposent sur les interactions physico-chimiques entre un excipient et la mucine du mucus (125) :

- *Théorie d'adsorption* : la plus répandue. Elle se base sur un ensemble d'interactions atomiques de surface entre les excipients mucoadhésifs et le mucus (forces de Van der Waals, liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes). Ces interactions sont capables de se créer rapidement lors du contact initial entre le mucus et l'excipient et restent réversibles tout au long du contact.

- *Théorie de diffusion-interpénétration* : dépend de la flexibilité et de la correspondance des chaînes de polymères avec la structure chimique de la mucine. Elle fait aussi intervenir les notions de coefficient de diffusion et de temps de contact de l'excipient avec le mucus pour expliquer l'enchevêtrement des chaînes de polymères avec celles de la mucine.

- *Théorie des interactions électroniques* : la mucine étant chargée négativement, il peut y avoir des interactions spécifiques (transfert d'électrons) en fonction de la nature électrique de l'excipient mucoadhésif. Dans cette théorie, l'adhésion est créée par la présence de forces attractives à l'interface mucus-excipient.

Expliquer un phénomène de mucoadhésion par l'utilisation d'une seule théorie est illusoire. Différents mécanismes peuvent intervenir simultanément voire chronologiquement, en intégrant une étape de contact puis de consolidation (Figure 28).

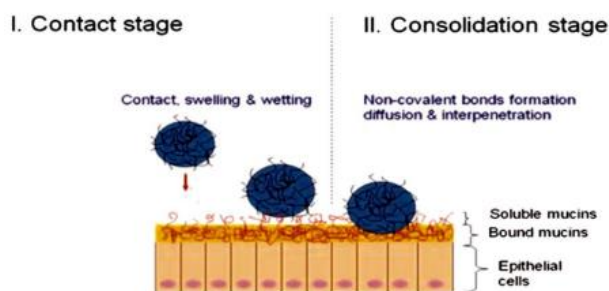
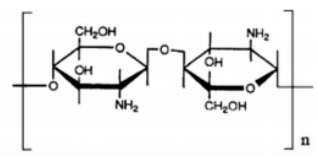
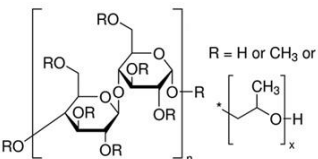
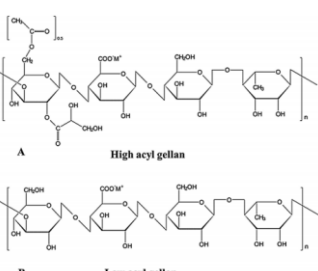


Figure 28 : Etapes de contact et de consolidation de la mucoadhésion. (126)

1.3.2. Polymères mucoadhésifs

La mucoadhésion nasale nécessite une mise en contact du bioadhésif avec la cavité nasale, puis sa pénétration dans la muqueuse nasale. Les poloxamères utilisés seuls ne semblent pas doués de très bonnes propriétés de mucoadhésion (123). Des excipients dits mucoadhésifs sont susceptibles de développer des interactions attractives avec le mucus, comme l'hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC), le chitosan ou la gomme gellane. Les principales propriétés physicochimiques de ces excipients mucoadhésifs sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Propriétés physicochimiques du chitosan, de l'HPMC et de la gomme gellane, modifié d'après Asane et al., 2008 (127).

Polymère bioadhésif	Propriétés physicochimiques
Chitosan 	Poids moléculaire $8,6 \cdot 10^4$ Da Viscosité 15-4000 cps (1 % sol aqueuse) Soluble dans l'eau froide Gélifiant, épaississant
HPMC 	Poids moléculaire d'environ 105 Da Viscosité <2000 cps (1 % sol acide acétique 1 %) Soluble en milieu acide Gélifiant
Gomme gellane 	Poids moléculaire d'environ 500 kDa Gélifiant, épaississant

Ces composés peuvent être avantageusement incorporés aux hydrogels de poloxamères pour leur conférer des propriétés de mucoadhésion. Différentes classifications de polymères mucoadhésifs existent selon la source (synthétique ou naturelle), l'hydrosolubilité, la charge électrique.

Le chitosan est un polysaccharide cationique produit à partir d'une réaction de désacétylation de la chitine (polysaccharide naturellement produit par de nombreuses espèces animales ou fongiques). Son mécanisme d'adhésion repose sur la création de liaisons hydrogène et hydrophobes, ainsi que des réactions de type électrique entre ses fonctions amines primaires et les groupement d'acide sialique et sulfoniques présents dans le mucus (128,129). L'HPMC est un excipient mucoadhésif synthétique non ionique dérivé de la cellulose. Le chitosan et ses dérivés restent les excipients mucoadhésifs les plus largement étudiés dans la littérature. La gomme gellane est un excipient mucoadhésif cationique polysaccharidique composé de D-glucose, de L-rhamnose et d'acide D-glucuronique d'origine bactérienne (*Sphingomonas elodea*). Le polymère naturellement produit présente un haut degré d'acétylation et diffère drastiquement du composé modifié (faiblement acétylé) en termes de bioadhésion (130). Des travaux ont pu être menés sur l'intérêt de formulations rendues mucoadhésives par l'utilisation de gomme gellane dans le cadre d'un vaccin (antigènes de virus *influenza sp.*) administré par voie intranasale (131).

2. Liposomes

Afin d'assurer la protection du PA hydrophile véhiculé dans un hydrogel thermosensible et mucoadhésif administré dans la cavité intranasale et également pour maîtriser et prolonger sa durée de mise à disposition dans le SNC, il peut être avantageux d'avoir recours à une stratégie de vectorisation. De nombreux vecteurs micro et nanoparticulaires font actuellement l'objet de recherches afin de pouvoir encapsuler des PA fragiles, ne franchissant pas les barrières biologiques de l'organisme ou encore des PA toxiques dont la distribution doit être limitée. Dans le cadre de ce travail, il a été décidé de développer un type de vecteur particulier que sont les liposomes.

2.1. Applications thérapeutiques

Les liposomes sont doués de nombreuses capacités d'encapsulation vis-à-vis des PA de par la nature amphiphile de ses constituants. Ils sont capables d'encapsuler des PA lipophiles ou hydrophiles, mais aussi des structures bien plus complexes comme de l'ADN. De plus, les liposomes constituent des vecteurs particuliers personnalisables sur lesquels de nombreux éléments chimiques et biologiques peuvent être greffés (Figure 29). Cette quasi infinité de possibilités présente un fort potentiel d'innovation thérapeutique dans le

traitement d'un nombre, lui aussi, important de pathologies. De plus les liposomes sont biocompatibles, biodégradables et non toxiques (132).

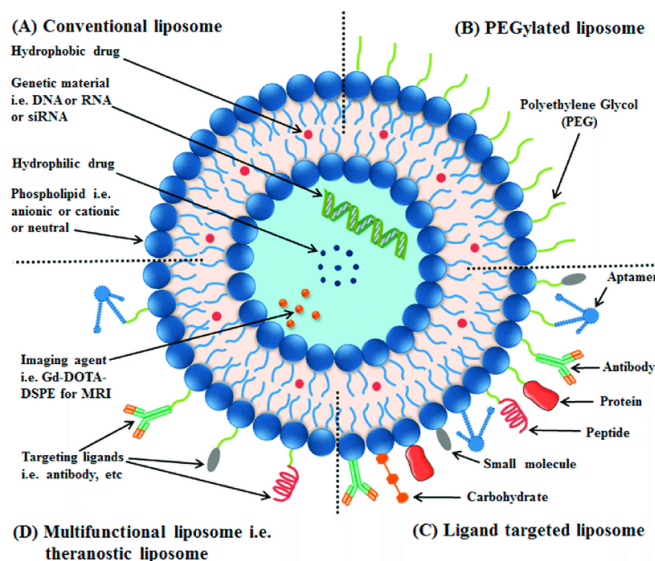


Figure 29: Les différents types de liposomes et PA / ligands utilisables (133).

2.2. Liposomes et voie intranasale

Différents systèmes micro- et nanoparticulaires ont été proposés pour administrer des PA par voie intranasale pour en permettre un gain de biodisponibilité intracérébrale, comme par exemple, des microparticules (134) et des nanoparticules à base de chitosan (135), des nanoparticules lipidiques solides (136) ou encore des liposomes (137). Les liposomes permettent de véhiculer aussi bien des PA hydrophobes qu'hydrophiles (ex. acyclovir (138), desmopressine (139), insuline (140)). Enfin, il a été rapporté que les liposomes bénéficient d'une meilleure pénétration intracérébrale que d'autres systèmes de type nanoparticule administrés par voie intranasale (141).

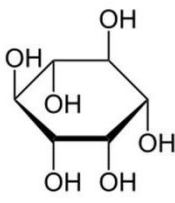
2.3. Composition

Les liposomes de leur étymologie grecque *lipos* : gras et *soma* : corps, ont été développés dans les années 1960 avec les travaux sur un modèle membranaire destiné à l'étude physiologique des cellules par Bangham *et al.* (142). Les liposomes sont composés d'une ou plusieurs doubles couches de phospholipides composant une écorce externe lipophile, et d'un cœur hydrophile.

2.3.1. Phospholipides

Les phospholipides, et plus particulièrement, les glycérophospholipides, sont constitués d'une tête hydrophile polaire composée d'un groupement phosphate et d'un groupement spécialisé (Tableau 4), et d'une queue (corps gras) apolaire qui est l'association de deux acides gras estérifiés liés à une molécule de glycérol (Figure 30). Les têtes apolaires sont orientées vers l'extérieur et l'intérieur du liposome qui sont composés de milieu aqueux et les queues apolaires sont orientées vers l'intérieur de la bicouche lipidique.

Tableau 4 : Groupement spécialisés rattachés au groupement phosphate des phospholipides.

Nom du phospholipide	Abréviation	Groupement associé au groupement phosphate
Phosphatidylcholine	PC	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$
Phosphatidyléthanolamine	PE	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$
Phosphatidylsérine	PS	$-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{COO})\text{NH}_3^+$
Phosphatidylinositol	PI	
Phosphatidylglycérol	PG	$-\text{CH}_2\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$

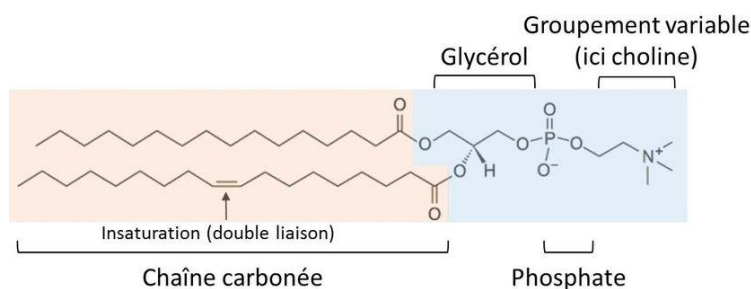


Figure 30 : Structure d'un phospholipide (ici de la phosphatidylcholine), d'après www.avantilipids.com.

Les acides gras estérifiés des phospholipides peuvent présenter une ou plusieurs doubles liaisons appelées insaturations. Ces insaturations sont utilisées pour définir la nomenclature des deux acides gras estérifiés du phospholipide, mais peuvent aussi définir une orientation dans l'espace des chaînes d'acide gras. Si la forme occupée par un phospholipide devait être représentée dans l'espace, il serait obtenu des formes très différentes qui seraient fonction des groupements de la tête et de la queue apolaire des phospholipides : des trapèzes, des cônes (petite tête polaire et acide gras insaturés), ou encore des rectangles (acide gras saturés). Ce polymorphisme de phospholipides se

retrouve naturellement dans les membranes biologiques, dont ils sont les principaux constituants, et expliquent en partie la courbure de celles-ci, en particulier pour des membranes à bicouche asymétrique (composition en phospholipides différente) (Figure 31). Les phospholipides jouent un rôle de structure de la membrane cellulaire. Ils ont un impact important sur la rigidité membranaire. La rigidité des membranes cellulaires est généralement déterminée par la quantité d'interactions faibles (interactions de Van der Waals) entre les queues hydrophobes des lipides, modulées par leur degré d'insaturation et leur longueur. Plus les queues hydrophobes sont longues, plus le nombre d'interactions faibles est grand et plus la rigidité de la membrane cellulaire sera forte. A l'inverse, une insaturation dans les chaînes d'acide gras pourra créer un décalage des lipides dans la bicouche lipidique entraînant donc une diminution des contacts entre les lipides et donc une diminution de la rigidité membranaire. Ce défaut « d'empilement » des lipides aura aussi pour conséquence une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions et aux molécules d'eau. La rigidité membranaire peut également être modulée par l'ajout de stérols comme le cholestérol.

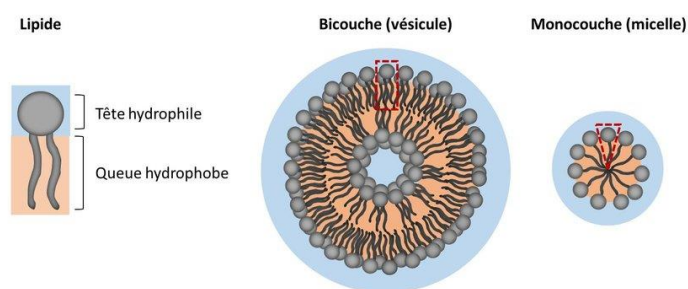


Figure 31 : Représentation schématique de la réorganisation des lipides, d'après Motta (143)

Il existe donc de nombreux types de phospholipides : naturels ou synthétiques, à acide gras saturé ou insaturé, chargés électriquement ou neutres. De plus, chaque lipide possède une température spécifique caractérisant le passage des lipides d'une phase « gel » à une phase « liquide », appelée température de transition de phase. Elles permettent de déterminer les meilleures conditions de conservation des lipides et certaines conditions de préparation (température de chauffage des lipides) pour l'obtention de liposomes. Ces différentes propriétés peuvent donc modifier les propriétés granulométriques des liposomes, leur conservation, leur coût de production... Les principaux types de phospholipides utilisés sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Principaux phospholipides employés dans la formulation de liposomes.

Type	Nom	Abréviation	Saturations	Charge
Naturels	Phosphatidylcholine de jaune d'œuf	EPC		
	Phosphatidylcholine de soja	SPC		
Synthétiques	Dimyristoylphosphatidylcholine	DMPC	14 :0	Neutre
	Distéaroylphosphatidylcholine	DPPC	16 :0	
	Dioleoylphosphatidylcholine	DSPC	18 :0	
	Dimyristoylphosphatidyléthanolamine	DOPC	18 :1	
	Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine	DMPE	14 :0	
	Distéaroylphosphatidyléthanolamine	DPPE	16 :0	
	Dioleoylphosphatidyléthanolamine	DSPE	18 :0	-1
	Dimyristoylphosphatidylglycérol	DOPE	18 :1	
	Dipalmitoylphosphatidylglycérol	DMPG	14 :0	
	Distéaroylphosphatidylglycérol	DPPG	16 :0	
	Dioleoylphosphatidylglycérol	DSPG	18 :0	
	Dipalmitoyl acide phosphatidique	DOPG	18 :1	-1 à -2
	Dipalmitoylphosphatidylsérine	DPPA	16 :0	- 1

2.3.2. Cholestérol

Parmi les autres constituants des liposomes les plus répandus se trouve le cholestérol. C'est un lipide amphiphile faisant partie de la famille des stérols qui fut découvert en 1758 par un pharmacien, le docteur François Poulletier de la Salle, et dont le nom (du grec *chole* : bile et *stereos* : solide) fut donné par un chimiste, Eugène Chevreul. Le cholestérol est composé d'un noyau tétracyclique (cyclopentano-perhydro-phénanthrénique) et d'une chaîne hydrocarbonée dont la structure est présentée en Figure 32. Le cholestérol est un élément important des membranes biologiques, ainsi que de la gaine de myéline. A l'inverse des phospholipides, il ne forme pas de bicouche lipidique. Le cholestérol est capable de s'insérer facilement entre deux phospholipides de par sa conformation et son caractère central lipophile, en orientant sa tête polaire composée d'une fonction alcool (-OH) vers le milieu aqueux. Il possède un rôle principal de modification de la rigidité des membranes cellulaires, intervenant dans de nombreux processus cellulaires (absorption, déformation, mouvement des constituants le membrane cellulaire). Le cholestérol a été incorporé à la préparation des liposomes pour augmenter leur stabilité (144). L'insertion de cholestérol entre deux phospholipides améliore l'hydratation des têtes polaires et améliore l'ordre et l'empilement des lipides au sein de la bicouche lipidique, ce qui favorise la stabilité *in vitro* des liposomes et leur capacité de rétention des PA hydrophiles encapsulés (145).

Généralement, à partir d'une concentration supérieure à 30 mol% de la concentration en lipides totaux, le cholestérol exerce une action désorganisatrice dans la membrane des liposomes pouvant aller jusqu'à rompre la structure linéaire de la bicouche lipidique entraînant une diminution de la stabilité des liposomes et de leur capacité d'encapsulation (146). Le cholestérol est un élément important dans la rigidité membranaire et il est fréquemment retrouvé des liposomes comportant entre 5 et 45 mol% de cholestérol dans leur formulation.

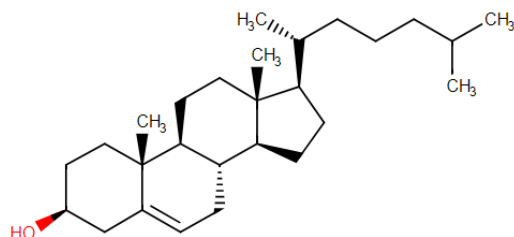


Figure 32 : Structure du cholestérol, d'après www.drugbank.ca.

2.4. Classification des liposomes

Il existe différents types de liposomes qui peuvent être classés selon leurs propriétés physiques telles que la lamellarité (nombre de bicouches de phospholipides) et leur taille (147). La taille des liposomes peut varier du nm au μm (0,025 μm – 2,5 μm). La taille est un paramètre très important concernant le devenir des liposomes après administration dans l'organisme (demi-vie des liposomes, mécanisme d'élimination), mais aussi la capacité d'encapsulation du PA (plus le volume d'un liposome est important, plus sa capacité d'encapsulation est forte). Une première classification peut être réalisée à partir de ce paramètre : les liposomes multi lamellaires (*Multilamellar Vesicles MLV*) et les liposomes uni-lamellaires. Ces dernières peuvent être classées en deux catégories selon leurs tailles : les grands liposomes (*Large Unilamellar Vesicles LUV*) (diamètre 100 à 1000 nm) et les petits (*Small Unilamellar Vesicles SUV*) (diamètre 20 à 100 nm). Ces différents types de liposomes sont illustrés Figure 33. Les liposomes uni-lamellaires n'ont donc qu'une seule bicouche de phospholipides comprenant un unique compartiment central aqueux. Les structures multi-lamellaires (diamètre généralement > 500 nm) correspondent à une structure concentrique de bicouches de phospholipides de diamètre de plus en plus petit séparées par des couches de milieu aqueux (structures en « oignon » ou en « poupée russe »). Il existe d'autres structures de liposomes appelées OLV (*Oligolamellar Vesicles*). Ce sont des vésicules de 100 à 500 nm de diamètre comptant environ 5 bicouches concentriques. Un dernier type de liposome existe, les *GUV* (*Giant Unilamellar Vesicles*), leur taille est comprise au-delà de 1 000 nm.

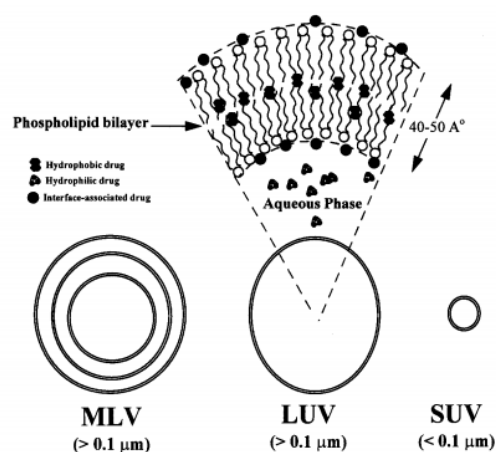


Figure 33 : Classification des liposomes selon leur taille et leur lamellarité (148).

2.5. Méthodes de préparation des liposomes

Différentes méthodes de préparation existent. Leur choix dépend notamment des propriétés physicochimiques de la molécule à encapsuler, la concentration en PA souhaitée, les propriétés granulométriques et de surface visées et enfin la reproductibilité à grande échelle de la méthode de production des liposomes. Seule la méthode de production de liposome utilisée dans le cadre de ce travail sera développée.

2.5.1. Hydratation d'un film lipidique

La méthode de réhydratation d'un film lipidique a été pour la première fois décrite par Bangham *et al.* (142). Les lipides (hydrophobes) sont solubilisés dans un solvant organique (ou mélange de différents solvants organiques). Ce mélange doit être le plus homogène possible afin d'obtenir une solution claire et limpide de lipides. Ce solvant est ensuite évaporé (courant sec d'azote, évaporation rotative sous vide) laissant les lipides sous la forme d'un film lipidique, autrement appelé « *lipid cake* ». Ce film lipidique est composé d'une superposition de lamelles (bicouche de phospholipides) les unes sur les autres. Ce film lipidique peut ensuite être conservé pendant plusieurs jours s'il est conservé à basse température (-20 °C). Ce film est ensuite réhydraté à l'aide d'un solvant aqueux. Les milieux d'hydratation qui sont fréquemment retrouvés pour les administrations *in vivo* de liposomes sont de l'eau distillée, des solutions tampons, du sérum physiologique (NaCl 0,9 %) et des solutions non-électrolytiques telles que des solutions de dextrose 5 % ou de saccharose 10 %. Lors de la mise en contact du milieu aqueux avec le film lipidique, la température du milieu hydratant doit être supérieure à la température de transition T_m du lipide ayant la T_c la plus élevée pour s'assurer que tous les lipides soient à l'état liquide. Cette température devra être maintenue dans le milieu aqueux tout au long de la préparation. La durée d'hydratation

peut légèrement différer selon les espèces et la structure des lipides. Elle doit être suffisamment longue et vigoureuse pour permettre aux lipides présents sur les parois de se détacher et être répartis de façon homogène au sein de la phase aqueuse. Durant cette phase d'hydratation, les queues hydrophobes des phospholipides se regroupent entre elles afin de ne pas s'exposer au milieu aqueux, ce qui conduit à la formation de vésicules sphériques. Ces vésicules sphériques sont des MLV qui ont emprisonnés en leur centre une quantité plus ou moins importante de milieu aqueux. Cette méthode permet l'encapsulation de PA hydrophobes et hydrophiles. Il pourra être solubilisé soit dans la phase aqueuse soit dans le mélange initial de solvants organiques permettant la solubilisation des lipides. Les différentes étapes de cette méthode de préparation sont illustrées dans la Figure 34.

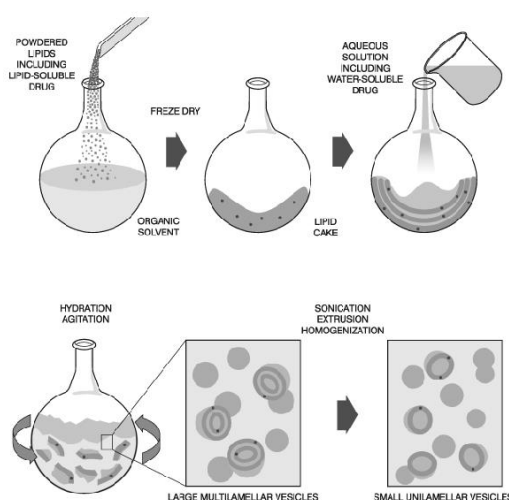


Figure 34 : Principe de préparation des liposomes par hydratation d'un film lipidique, d'après Burgess (1998).

Il est nécessaire de la coupler avec une méthode permettant l'homogénéisation des liposomes avec l'obtention de LUV à partir de MLV (étape d'extrusion par exemple) afin d'obtenir d'une population de liposomes uniformes (distribution de diamètre des liposomes homogène).

2.5.2. Extrusion

L'extrusion est une méthode mécanique d'homogénéisation d'une suspension de MLV pour l'obtention de LUV. Le principe de l'extrusion consiste à forcer le passage (plusieurs allers et retours) d'une suspension de MLV à travers un extrudeur (Figure 35). Cet appareil est composé de deux filtres en polycarbonate rigides et de porosité déterminée. Le diamètre moyen des liposomes obtenus sera directement lié à la porosité des filtres utilisés. Cette technique facile et simple à mettre en œuvre présente un inconvénient spécifique : l'encrassement des membranes de polycarbonate au fur et à mesure du passage de la

suspension de liposomes. Cet encrassement peut induire une rétention et une absence d'extrusion de certaines MLV de la suspension. Plusieurs techniques permettent de prévenir ce phénomène et d'améliorer l'obtention d'une population de liposome homogène :

- L'extrusion doit être réalisée à une température supérieure à celle de la T_m la plus élevée des lipides en suspension pour être certains d'avoir des lipides dans un état fluide.
- Réaliser des cycles de congélation décongélation de la suspension de MLV. Cette étape permet de fragiliser la membrane des liposomes et d'obtenir une reconstruction de ces derniers sous la forme de vésicules uni-lamellaires.
- Réaliser une extrusion préliminaire avec un filtre dont les pores sont supérieurs au diamètre des LUV souhaitée. Dans le cadre de ce travail il a été réalisé pour les préparations à forte concentration de lipides, une première extrusion sur membrane à 400 nm de porosité puis une seconde extrusion sur une membrane de 100 nm de porosité.

L'extrusion à travers des pores de 100 nm donne généralement des vésicules uni-lamellaires de 120 - 140 nm. Cela peut s'expliquer par la déformabilité des LUV due à la mobilité des phospholipides dans la bicouche. Cette technique permet l'obtention d'une population de LUV homogène dont le diamètre dépend de la porosité du filtre utilisé, du nombre de passage des liposomes à travers les filtres, et de la composition en lipides. Cette méthode est parfaitement reproductible d'un lot à l'autre (147).

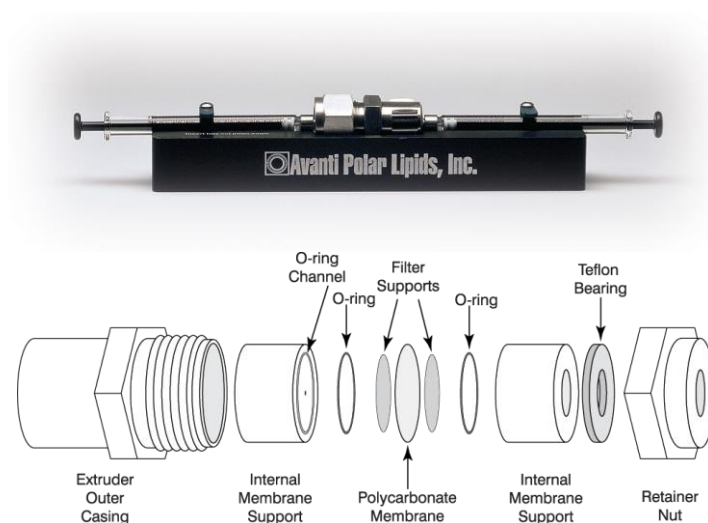


Figure 35 : Photographie et composition d'un extrudeur, tirés de www.avantilipids.com.

2.6. Caractérisation physico-chimique des liposomes

Les liposomes produits peuvent être par la suite caractérisés selon leur taille et leurs propriétés de surface.

2.6.1. Détermination des propriétés granulométriques des liposomes

La détermination de la taille des liposomes est une des caractéristiques les plus étudiées. Il existe de nombreuses méthodes de détermination de la taille de particules. Le choix de l'une d'entre elles est dépendante de la taille des particules à étudier : diffraction à rayons X et photo-corrélation pour des particules de 6 Å à 6µm aux techniques de microscopie pour les particules de 0,5 µm à plusieurs cm. Pour la détermination des LUV, la méthode d'analyse selon la granulométrie laser ou diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*) est utilisée. Cette méthode repose sur l'interaction entre une onde lumineuse monochromatique (laser) et une population de particules. Ces dernières ne doivent être soumises qu'au mouvement brownien (mouvement aléatoire, non ordonné, généré par les collisions des particules entre elles). La vitesse du mouvement brownien d'une particule (en condition de dilution suffisante, c'est-à-dire que le mouvement d'une particule n'est pas influencé par l'une de ses voisines) est défini par sa taille, la viscosité et la température du milieu d'analyse. A viscosité et température constantes, plus l'objet (particule) est petit et plus la vitesse de ce dernier sera importante. Lors de l'analyse, un faisceau incident (laser) de longueur d'onde définie (de façon à pouvoir interagir avec l'objet) pointe une suspension de particules. Un détecteur (photo-multiplicateur) mesure le taux de fluctuation de la lumière diffusée. Cette variation de lumière est directement corrélée à la vitesse des particules dans le milieu. Une fonction de corrélation permet ensuite de déterminer un degré de cohérence pour une particule. En clair, plus la particule est petite, plus son mouvement brownien est rapide et important et plus le degré de cohérence va décroître dans le temps. Le principe d'analyse est illustré dans la Figure 36. La détermination d'un ensemble de taille des particules en suspension permet de définir l'indice de polydispersité (PDI). Un PDI réduit (<0,2) est un marqueur de l'obtention d'une population de liposomes homogène en taille. L'appareil réalisant cette mesure est appelé un granulomètre. Cette méthode de détermination de la taille des particules sera utilisée dans le cadre de ce travail car elle permet de réaliser des mesures rapides, reproductibles et justes (149).

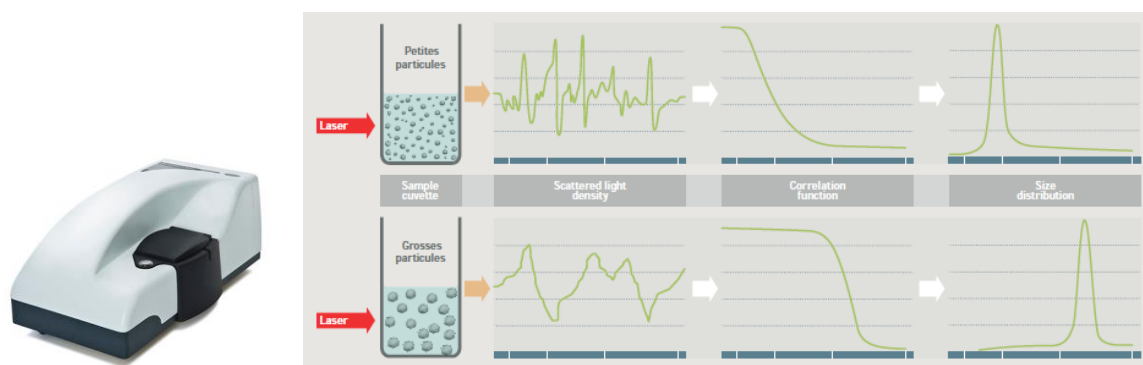


Figure 36 : Photographie d'un granulomètre (Malvern NanoZetasizer®) et principe d'analyse par diffusion dynamique de la lumière, tiré de www.malvernpanalytical.com.

2.6.2. Détermination du potentiel ζ des liposomes

Le potentiel de surface d'une nanoparticule représente schématiquement la charge électrique présente à la surface d'une particule (Figure 37). Il est déterminé en pratique par la mesure d'un potentiel particulier de surface qui est le potentiel ζ (zêta). Il existe une couche profonde d'ions ancrée à la particule (couche dense) et une autre couche plus périphérique (couche diffuse). Il existe entre ces deux couches un plan dit « plan de cisaillement ». La différence de potentiel qui existe entre le plan de cisaillement et le milieu de dispersion correspond au potentiel ζ . Il correspond précisément à la mesure de l'intensité de répulsion ou d'attraction électrostatique entre les particules en suspension. Il est utile de mesurer ce potentiel car sa détermination permet de mieux comprendre les interactions entre particules, et ainsi par exemple, expliquer certains phénomènes de dégradation des liposomes (agrégation, floculation). La modification de ce potentiel ζ par la modification de la composition en lipide des liposomes ou de la concentration en ion du milieu de diffusion (solvant aqueux) peut permettre d'améliorer la stabilité d'une suspension liposomale (temps de conservation plus long). La mesure de ce potentiel ζ peut être réalisée sur l'appareil illustré précédemment (Malvern NanoZS®) par une technique d'électrophorèse laser Doppler.

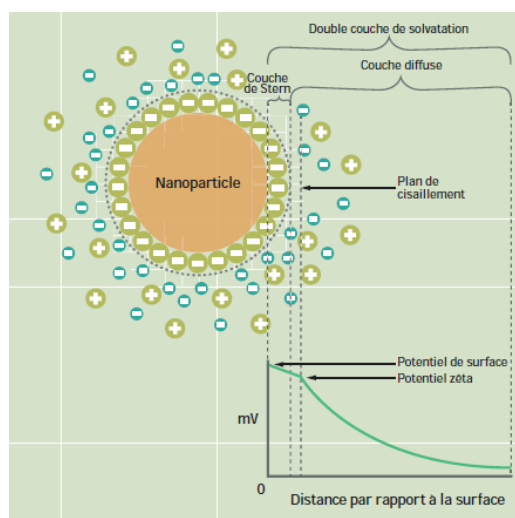


Figure 37 : Disposition des ions autour d'une particule et détermination du potentiel ζ , tiré de www.malvernpanalytical.com.

2.7. Devenir des liposomes et libération du principe actif

La libération du PA à partir des liposomes peut être due à différents mécanismes :

- Libération passive simple : diffusion du PA à travers la membrane du liposome selon la loi de Fick et qui survient durant tout le temps où le liposome est administré *in vivo*.

- Libération passive / active du PA après interaction avec des cellules : elle peut avoir lieu elle aussi selon différents mécanismes illustrés dans la Figure 38. Les liposomes peuvent fusionner avec la membrane cellulaire par adsorption, être destabilisés par un des constituants de la membrane cellulaire, ou enfin être internalisés par endocytose (spécifique ou non spécifique) puis dégradés selon l'action du pH acide intra lysosomal ou libérés dans le compartiment intra cellulaire.

- Destabilisation du liposome : soit par des facteurs internes ou externes comme le pH, la présence d'enzymes, la température, ...

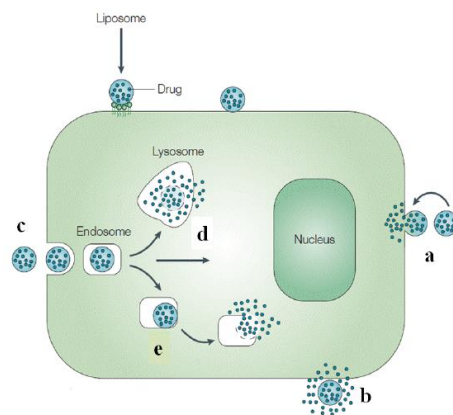


Figure 38 : Libération de PA encapsulé dans un liposome après une interaction liposome - cellule (150).

Il est donc nécessaire de pouvoir maîtriser et optimiser la vitesse et la concentration de PA intact libéré afin qu'il puisse se rendre biodisponible en quantité suffisamment importante pour pouvoir exercer son effet thérapeutique. Un des paramètres qui permet de moduler efficacement le taux d'encapsulation en PA et sa libération est le ratio PA/lipide présent dans la formulation. La détermination optimale de ce paramètre sera réalisée lors de ce travail.

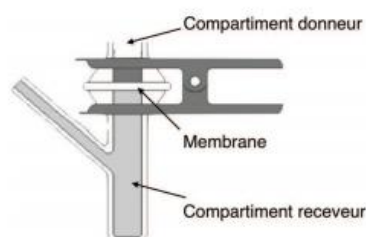


Figure 39 : Schéma d'une cellule de Franz.

Dans le cadre de cette étude, les expériences de cinétique de libération du PA sont basées sur l'utilisation de cellules de Franz, illustrées Figure 39. La cellule de Franz est un dispositif contenant un compartiment receveur et un compartiment donneur séparé par une membrane de porosité déterminée permettant une diffusion simple passive du PA (151). La porosité de la membrane doit permettre le passage du PA tout en empêchant la diffusion de liposomes. Le compartiment donneur reçoit la formulation comprenant le PA à libérer. Pour ne pas perturber la diffusion du PA du compartiment donneur vers le compartiment receveur, le volume du compartiment donneur a été calculé de manière à ce que la concentration en PA soit toujours inférieure à 10-30 % de sa solubilité (condition *sink*). Cette condition permet de minimiser un possible effet de ralentissement qu'aurait une saturation du milieu sur la libération du PA. Cela permet d'éviter que les conditions expérimentales *in vitro* soient différentes de celles intervenant *in vivo*. Des prélèvements successifs et réguliers sont réalisés dans le compartiment receveur pour établir un profil cinétique de libération du PA. Après un temps de diffusion suffisamment long, il sera nécessaire de déterminer les caractéristiques granulométriques et la concentration en liposomes contenue dans le compartiment donneur. Cela permet de déterminer si les conditions expérimentales ne dénaturent pas les liposomes, si la membrane de diffusion n'est pas altérée et toujours imperméable aux liposomes et enfin connaître le pourcentage de PA encore encapsulé.

III. Problématique

L'objectif de ce travail est de développer et de caractériser une formulation susceptible de permettre la libération à dose efficace au niveau central d'un PA hydrophile d'intérêt thérapeutique potentiel dans le traitement de la MA après administration par voie intranasale. Pour ce faire, la faisabilité d'une formulation devant gélifier dans la cavité nasale (soit à 32-35 °C (116,152)), compatible et non toxique pour la muqueuse nasale et ses cils vibratiles (composition, osmolarité, pH, viscosité maîtrisés en cohérence avec les recommandations de la Pharmacopée Européenne (105) et les données de la littérature (106,153) et présentant une teneur en PA adaptée à de futures études biologiques (Tableau 6) sera étudiée. Pour optimiser la rémanence de la formulation dans la cavité nasale en surmontant la clairance nasale mucociliaire, la formulation devra être mucoadhésive. Pour atteindre une cinétique de libération maîtrisée et une biodisponibilité suffisante du PA au niveau central, celui-ci sera encapsulé dans des liposomes. Les performances d'encapsulation, les propriétés granulométriques et de charge de surface seront déterminées. La formulation liposomale sera incluse dans l'hydrogel retenu et ne devra pas en dénaturer les propriétés. L'objectif *in fine* de ce travail est de pouvoir disposer d'une formulation optimisée pouvant faire l'objet d'études biologiques par la suite.

Tableau 6 : Cahier des charges et critères qualités optimales des gels à formuler.

Paramètre	Critère qualité
T° _{sol-gel} (°C)	32 - 35 (116)
Osmolarité (mOsmol)	300 ± 20 (106)
Viscosité (Pa.s)	12 ± 2 (106)
pH	6 ± 3 (105)
Teneur en PA (% m/m)	0,1 - 1 (1)

IV. Matériels et méthodes

A. Matériels

L'acétonitrile (ACN) de qualité HPLC, l'acide formique ($\geq 99-100\%$), le chloroforme, l'eau de qualité HPLC et le méthanol (MeOH) de qualité HPLC ont été fournis par Prolabo VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). L'acétylcholinestérase (AChE) d'anguille électrique, l'acide 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) (DTNB), la butyrylcholinestérase (BuChE) de sérum équin, le chitosan oligosaccharide lactate (Masse moléculaire=5000 g/mol), le cholestérol ($\geq 95\%$), le diméthylsulfoxyde (DMSO) ($\geq 99,5\%$), le Donépézil hydrochloride monohydrate ($\geq 98\%$), la gomme gellane, l'hydroxypropylméthyl cellulose (HPMC) (viscosité 80-120 cP à 2 % dans l'eau à 20 °C), l'iodure d'acétylthiocholine ($\geq 98\%$), l'iodure de butyrylthiocholine, l'iodure de propidium ($\geq 94\%$), la mucine porcine d'estomac de type II et le gel de Sepharose® CL-4B : Sephadex™ ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le chlorhydrate de tacrine a été obtenue chez Tocris Bioscience (Bristol, Royaume Uni). La cortisone, le tampon Prisma HT pH 7,4, le tampon sink brain et la théophylline ont été fournis par pION (Billerica, Etats-Unis). L'eau déminéralisée par résine échangeuse d'ions à lit mélangé (Distiplus DS450) et filtrée sur 0,2 μm est fournie par Grosseron, Couëron, France et Fisher Scientific, Illkirch, France. Le Lipoid® E PC (Phosphatidylcholine d'œuf, PC) et le Lipoid® S100 (Phosphatidylcholine de soja, SPC) ont été fournis gracieusement par Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Allemagne). Le Kolliphor® P188 (poloxamère 188, P188, ou polyoxyéthylène (160) polyoxypropylène (30) glycol) et le Kolliphor® P407 (poloxamère 407, P407, ou poly oxyéthylène (196) polyoxypropylène (67) Glycol) ont été achetés chez BASF (Levallois-Perret, France).

B. Méthodes

1. Caractérisation des propriétés du PA

1.1. Evaluation *in vitro* de son activité inhibitrice de l'AChE et de la BuChE

La méthode d'Ellman est la méthode standard utilisée pour détecter et quantifier une activité inhibitrice de l'AChE et de la BuChE (154). Cette méthode est basée sur le clivage de l'iodure d'acétyl ou de butyrylthiocholine par l'AChE ou la BuChE respectivement. Cette réaction produit de l'iodure de thiocholine qui réagit alors à son tour avec l'acide 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) (DTNB) pour former un anion de couleur jaune, mesurable en spectrophotométrie à 412 nm. Le protocole opératoire est conforme à ce qui est utilisé en routine au laboratoire (1). Les valeurs d'absorbance à 412 nm ont été enregistrées pour le composé étudié (C finale de 10^{-6} et 10^{-5} M) et comparées aux valeurs de témoins et celles du Donépétil, utilisé comme référence. Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{V_0 - V_i}{V_0} \times 100$$

Avec V_i , l'activité enzymatique en présence d'inhibiteur

V_0 , l'activité enzymatique en absence d'inhibiteur

Les valeurs d' IC_{50} sont déterminées graphiquement en reportant le logarithme moyen du pourcentage d'inhibition aux différentes concentrations testées de molécule à l'aide du logiciel Prism®.

1.2. Evaluation *in vitro* de la compétition au site périphérique de l'AChE par le propidium

Le propidium est une molécule capable de se lier au site périphérique de l'AChE. Sa fixation entraînant une augmentation d'intensité d'émission de fluorescence, quantifiable par spectrophotométrie, il est utilisé comme sonde pour évaluer la capacité d'une molécule à se lier de façon compétitive à l'enzyme (155). L'expérience est réalisée dans des plaques 96-puits (volume réactionnel final de 200 μ L), à partir de 5 unités d'AChE d'anguille électrique dissoute dans un tampon Tris HCl (1 mM, pH 9) et de 150 μ L de la solution testée à 10^{-5} M (PA ou Donépétil utilisé comme référence, dissous dans du DMSO). Après incubation de 6 h à 25 °C, 30 μ L d'une solution d'iodure de propidium ($C_{\text{finale}}=1$ μ M) sont ajoutés. La mesure de la fluorescence est réalisée en triplicat, après 10 min, en utilisant un spectrophotomètre (TECAN Infinite 200 Pro, Männedorf, Suisse), à $\lambda_{\text{exc}}=535$ nm et $\lambda_{\text{em}}=595$ nm.

1.3. Détermination de la perméabilité du PA par méthode PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay)

Le protocole utilisé est celui indiqué par le fournisseur (Pion Inc, Wosburn, MA, USA). Brièvement, les composés sont dilués à 20 mM dans de l'eau ou du DMSO en fonction de leur solubilité, puis à 100 μ M dans le tampon Prisma HT Buffer pH 7,4 (pION). 200 μ L de cette solution sont placés dans les puits de la plaque donneuse. 5 μ L de lipides BBB-1 Lipid sont déposés sur les filtres de la plaque acceptrice. 200 μ L de tampon Sink Brain sont ajoutés dans les puits de la plaque acceptrice. Le sandwich est alors assemblé puis incubé 4 heures à température ambiante sans agitation. Le sandwich est séparé puis les spectres UV-visible sont déterminés dans les compartiments donneurs et accepteurs avec le lecteur de plaque (Tecan infinite M200). Le log Pe est calculé grâce au logiciel PAMPA Explorer software v. 3.7 (pION). La cortisone qui présente une perméabilité élevée et la théophylline qui ne diffuse pas sont utilisées comme références. Les mesures sont réalisées en 6 répliques.

2. Formulation et caractérisation des propriétés du gel

2.1. Préparation des solutions de polymères

Les gels sont préparés par la « Cold Method » décrite par Soga *et al.* (156). Des quantités adaptées d'excipients (P407, P188, HMPC, gomme gellane et/ou chitosane) préalablement pesés sous forme de poudre, ont été ajoutés à 1 mL d'eau déminéralisée (pH 6-7) dans un tube à fond incurvé. La solution est laissée sous agitation magnétique (Ika® RET basic) à 500 tours par minute (tpm) pendant 30 minutes à 4 °C, jusqu'à dissolution complète des excipients et l'obtention d'une solution limpide. Après agitation, les solutions sont conservées au réfrigérateur à 4 °C pendant 2h minimum avant caractérisation.

2.2. Détermination de la température de transition sol-gel

La formation du gel sous l'effet de la température est objectivée par méthode visuelle (157). L'échantillon contenu dans un tube à hémolyse est immergé dans un bain-marie à 15 °C sous faible agitation magnétique (100 tpm). La température du bain-marie est augmentée de +2 °C / min jusqu'à 60 °C. La température de gélification ($T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$) correspond à la température relevée pour laquelle la solution se transforme en gel, objectivé par retournement du flacon.

La $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ peut être également évaluée par mesure rhéologique à partir du suivi des modules élastiques G' et visqueux G'' en fonction de la température. Pour ce faire, un rhéomètre AR2000 (TA Instruments, Guyancourt France) équipé d'un disque plan-cône de 4 cm de diamètre et d'un angle de 1,59° a été utilisé. 600 μ L de l'échantillon sont placés sur le plateau d'analyse. Il a été défini qu'un stress oscillatoire de 25 Pa permet de garantir les domaines de

linéarité pour les états liquides et solides. En appliquant ce stress oscillant de 25 Pa, la valeur des modules G' et G'' a été relevée à une fréquence d'oscillation de 1Hz sur 300 mesures régulières effectuées au cours d'un chauffage progressif de l'échantillon (3 min à 10 °C puis augmentation de 5 °C/min jusqu'à 50 °C).

2.3. Etude en rhéologie des hydrogels

L'impact des liposomes sur les propriétés viscoélastiques du gel sélectionné a été étudié. L'ensemble des mesures de rhéologie a été réalisé grâce à un rhéomètre AR2000 (TA Instruments, Guyancourt France) avec une géométrie de type cône-plan (4 cm de diamètre, angle de 1,59°). L'échantillon a été déposé sur le plateau fixe du rhéomètre et la partie mobile (cône) est venu se placer au contact de l'échantillon. Les échantillons ont été soumis à un balayage en vitesse de cisaillement allant de 0,1 à 100 s⁻¹, à la température de 34 °C. Les échantillons ont été également soumis à un balayage en contrainte d'oscillation allant de 0 à 600 Pa (quand l'échantillon est expulsé du plateau), à la température de 50°C.

2.4. Détermination du pH et de l'osmolarité des gels

Le pH est déterminé par papier pH (Merck, Darmstadt, Allemagne) ou par utilisation d'une sonde pH CyberScan® pH11 (Eutech instruments, Landsmeer, Pays Bas). L'osmolarité est mesurée à l'aide d'un osmomètre (Löser Messtechnik, Delta Labo, Colombelles, France) par mesure du point de congélation sur un volume de 100 µL.

3. Formulation et caractérisation des liposomes

3.1. Préparation des liposomes

Les liposomes ont été formulés selon la méthode d'hydratation du film lipidique décrite par Bangham *et al.* (142). Des quantités définies de lipides (SPC / EPC et cholestérol) sont dissoutes dans 100 µL de phase organique (80 µL de chloroforme + 20 µL de méthanol). Après agitation par vortex, le solvant est évaporé sous flux d'azote. Le film lipidique obtenu est placé sous vide (10⁻¹ Pa) durant 3 h afin d'éliminer toute trace de solvant. Les films lipidiques obtenus peuvent être conservés à -20 °C durant 2 semaines pour analyse ultérieure. Le film lipidique est ensuite hydraté en ajoutant 1 mL de phase aqueuse, constituée d'eau de qualité HPLC, avec ou sans PA. La phase d'hydratation est accompagnée de 30 minutes d'agitation magnétique (80 tpm) à 40 °C combinées à 1 minute de vortex (1400 tpm) toutes les dix minutes. Les liposomes formés subissent ensuite une phase d'extrusion (Extrudeur Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA) de 13 allers-

retours sur une membrane en polycarbonate (Whatman® Nuclepore Track-Etched membrane) avec un seuil de coupure de 100 nm. Certaines formulations ayant une concentration de lipides à 120 mM bénéficient d'une extrusion préliminaire de 13 allers-retours sur une membrane de polycarbonate de porosité égale à 400 nm (Whatman® Nuclepore Track-Etched membrane).

3.2. Propriétés granulométriques et propriétés de surface des liposomes

Le diamètre hydrodynamique moyen (Z-average) et l'indice de polydispersité (PDI) sont déterminés par diffusion dynamique de la lumière (Nano ZS® Malvern, Worcestershire, Royaume-Uni) équipé d'un laser à 633 nm à un angle de diffusion fixe de 173° correspondant à une diffusion multiple minimale. Les échantillons sont analysés dans des cuves (Fisherbrand référence FB55143). La mesure du potentiel ζ a également été réalisée avec un nanoZS® dans des cellules DTS 1070, en utilisant une constante diélectrique de 78,5, un indice de réfraction de 1,33, une viscosité de 0,8872 cP et une tension de cellule de 150 V. Le potentiel ζ a été calculé à partir de la mobilité électrophorétique en utilisant l'équation de Smoluchowski. Les échantillons sont analysés en triplicat à une température fixe de 25 °C, après dilution au 1/50^{ème} dans l'eau de qualité HPLC.

3.3. Purification des solutions de liposomes par séparation colonne de gel Sephadex™

La purification des liposomes consiste à séparer le PA libre (non encapsulé) des liposomes. Le Sephadex™ est un gel de dextran (polymère de glucose α -1-6) auquel on a fait subir une réticulation. Il est utilisé en chromatographie d'exclusion pour séparer les éléments constituant l'échantillon, à pression atmosphérique, selon leur taille et plus spécifiquement selon le rayon de Stokes et par extrapolation, selon leur masse. Le gel est coulé après homogénéisation, dans une colonne d'un diamètre interne de 10 mm sur une hauteur de 150 mm. La colonne est ensuite mise au repos 24 h pour laisser le gel de Sephadex™ se compacter. La colonne est rincée par 50 mL d'eau de qualité HPLC. 400 μ L d'échantillons sont déposés dans la colonne. Lorsque l'échantillon a complètement pénétré dans le gel, 400 μ L d'eau HPLC sont déposés pour éviter une dilution de l'échantillon (ratio 1:1). Des volumes répétés de 1 mL d'eau HPLC sont déposés dans la colonne. Une première fraction (F_0) est prélevée par simple gravité avant le dépôt de l'échantillon. Le recueil des échantillons (F_1 à F_{12}) se fait par fraction de 500 μ L. La validation de cette méthode comme méthode séparative nécessite de vérifier la bonne séparation du PA libre des liposomes. Pour cela, un dosage en PA par UHPLC et un dosage en liposomes par la détermination du nombre de coups, « *Derived Count Rate* » (DCR) (158)) ont été effectués sur chaque fractions après dépôts de liposomes non chargés en présence ou non de PA.

3.4. Dosage des liposomes par méthode *Derived Count Rate* (DCR)

La méthode de dosage des liposomes a été développée selon la technique de Bastiat *et al.* (158) et l'utilisation de la diffusion dynamique de la lumière (Nano ZS® Malvern, Worcestershire, France) équipé d'un laser à 633 nm à un angle de diffusion fixe de 173°. Le DCR peut être calculé à partir des taux de comptage mesurés et le facteur d'atténuation (lié à la valeur de l'atténuateur). La formule de calcul du DCR est la suivante :

$$DCR = \frac{\text{Taux de comptage mesuré}}{\text{Facteur d'atténuation}}$$

Pour les valeurs d'atténuateur de 1 à 11, différents facteurs d'atténuation ont été fixés selon Malvern Instrument Ltd. Les suspensions de liposomes sont diluées dans l'eau pure et le DCR est mesuré par rapport à une gamme de concentration réalisée à partir de la suspension de liposomes étudiée avant sa purification. Le DCR calculé est donc proportionnel à la concentration de liposomes, pour une taille de liposome donnée.

3.5. Dosage du PA par UHPLC

La méthode de dosage du PA a été développée à l'aide d'une chromatographie de phase liquide haute performance (*Ultra High Performance Liquid Chromatography* UHPLC) de type Agilent® 1290 Infinity (Californie, Etats-Unis) couplée à un détecteur à barrette de diode DAD 1260 Infinity. La phase stationnaire utilisée est une colonne de type Ultra C18 (ResteFranceses, France) dont le diamètre des pores est de 5 µm, la longueur, 50 mm et la largeur, 2,1 mm. Le débit est de 0,8 mL/min et la température maintenue constante à 25 °C. Un volume de 4 µL d'injection est utilisé. La phase mobile est un mélange binaire avec, pour l'éluant A, une solution aqueuse d'acide formique à 0,1 % (v/v) et l'éluant B, une solution d'acétonitrile / acide formique 0,1 % (v/v). Le gradient utilisé est décrit dans le Tableau 7. La détection du PA est réalisée à une longueur d'onde spécifique du PA fixée à 214 nm.

Tableau 7 : Paramètres de gradient pour analyse UHPLC.

Temps (min)	A (%)	B (%)	Débit (ml/min)
0	3	97	0,8
0,8	10	90	0,8
1,5	40	60	0,8
2,5	40	60	0,8
2,51	95	5	0,8

La linéarité de la méthode de dosage est satisfaisante ($r^2 > 0,999$) dans l'intervalle de concentrations étudié (2,5 à 100 μM). Aucune différence n'est observée pour une gamme de PA dans de l'eau HPLC ou dans du MeOH. La gamme préparée est stable 5 jours à 4 °C. Il n'a pas été mis en évidence d'effet matrice des excipients utilisés pour la formulation des gels et des liposomes. Le dosage des différents échantillons est réalisé après une dilution suffisante dans du méthanol permettant l'obtention de concentration en PA compatibles avec la gamme de concentration utilisée.

3.6. Détermination du taux d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation (EE) correspond au pourcentage de PA encapsulé à l'intérieur des liposomes, le reste du PA étant qualifié de libre. L'EE a été calculé de la manière suivante :

$$\%EE = \frac{\text{Quantité de PA retrouvée dans les fractions de liposomes}}{\text{Quantité de PA initiale}} * 100$$

4. Préparation et caractérisation des gels contenant des polymères mucoadhésifs ou les liposomes

4.1. Préparation des gels contenant les liposomes

Les étapes de préparation sont identiques à celles du gel, à ceci près que les poloxamères en poudre sont solubilisés directement dans une solution liposomale préparée au préalable. La solution de liposomale est préparée et caractérisée de la même façon que précédemment. Dans certains cas les échantillons sont reconcentrés en passage sur centrifugeuse par une opération de filtration-centrifugation (ensemble de filtration Amicon™ Ultra 0.5, Merck™ et d'une double centrifugation pendant 15 min à 3000 tpm à l'aide d'un Universal 320R, Hettich, Bäch, Suisse) et à température ambiante pour palier au facteur de dilution et l'obtention d'une concentration suffisante. Les poloxamères en poudre ont ensuite été pesés puis la solution liposomale a été ajoutée. Enfin une quantité d'eau a été additionnée pour ajuster le volume finale de la solution. La formulation est ensuite placée sous agitation magnétique (40 tpm) à une température de 4 °C durant un temps suffisamment long pour obtenir la dissolution complète des poloxamères. Les préparations sont conservées à 4 °C pendant 12 h avant d'être caractérisées.

4.2. Préparation des gels contenant des polymères mucoadhésifs

Les étapes de préparation des gels sont identiques à celles décrites précédemment (chapitre 2.1, 6.1) à l'exception que des quantités adaptées d'excipients mucoadhésifs (gomme gellane, chitosan, l'hydroxypropylméthyl cellulose) représentant 0.5 % masse/masse (m/m) ont été ajoutées lors de l'incorporation du mélange de poloxamères en poudre dans la phase aqueuse (eau ou solution liposomale). La préparation de gel contenant des excipients mucoadhésifs est la même que celle décrite précédemment (paragraphe 2.1). La solution est laissée sous agitation magnétique à 500 tpm pendant au moins 30 minutes à 4 °C (cette durée peut augmenter en fonction de la limpidité de la solution). Les solutions sont ensuite gardées au réfrigérateur à 4 °C pendant 2 h avant caractérisation.

4.3. Caractérisation des gels modifiés

La température de gélification, le pH, l'osmolarité des gels contenant des polymères mucoadhésifs ou des liposomes sont évalués comme précédemment (paragraphe 2.2, 2.3 et 2.4). Le potentiel ζ , le PDI et la taille des liposomes ont été mesurés après incorporation dans le gel.

6. Etudes de mucoadhésion

La méthode est basée sur l'analyse des forces de détachement et du travail total d'adhésion à partir des résultats de l'aire sous la courbe de la force détectée en fonction de la distance. Ces analyses sont réalisées en partenariat avec le laboratoire URCOM (Unité de recherche en chimie organique et macromoléculaire, Le Havre, France) sur un texturomètre TA XT Plus® (Stable micro systems, Godalming, Surrey GU7 1YL, Royaume Uni) et le traitement des données est réalisé à partir du logiciel Exponent®. Le volume d'échantillon analysé est de 5 mL. Le milieu d'adhérence servant de modèle au mucus est un disque de 13 mm de diamètre préparé à partir de 250 mg de mucine porcine d'estomac compressé à l'aide d'une pastilleuse pendant 30 sec à 10 tonnes. La vitesse de descente de la sonde de sur laquelle est placée le disque de mucine, est de 0,5 mm/sec. La force appliquée sur le gel est de 5 g durant 120 secondes. La sonde est ensuite remontée à une vitesse de 0,5 mm/sec afin de mesurer le travail d'adhésion. Le gel est maintenu à 37 ± 1 °C tout au long de l'expérimentation grâce à un bain-marie.

7. Cinétiques de libération

La méthode est basée sur l'utilisation de cellules de Franz (151) couplée à un dosage du PA par la méthode UHPLC développée précédemment. Une membrane de dialyse Spectra/Por® (VWR TM) de porosité de 100 kDa est préparée selon un cercle de surface de 12,56 cm². Le volume du compartiment donneur est de 200 µL. Le volume du compartiment receveur est de 4 mL sous agitation magnétique peu intense. Le compartiment donneur est composé d'un milieu simulant le liquide nasal (*Simulated Nasal Fluid* SNF). Le SNF est composé de 8,77 g de NaCl, 2,98 g de KCl et 1,16 g de CaCl₂, 6 H₂O dilués dans de l'eau UHPLC qsp 1 L et ajusté à pH 6,5 (159). Les cellules de Franz sont placées dans un bain conditionné à 36 °C tout le temps de l'expérience. Des prélèvements de 80 µL du milieu accepteur suivis instantanément d'un remplacement de 80 µL de NSF dans le compartiment donneur sont réalisés à 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 et 240 minutes, de même un prélèvement de 1 mL est réalisé à 360 minutes. Les prélèvements à partir de t=30 min sont dilués au 1/5^{ème} dans du méthanol, et sont ensuite analysés par méthode UHPLC comme décrit ci-dessus. A la fin de la cinétique, les propriétés granulométriques des liposomes du compartiment donneur sont analysées selon la méthode précédemment citée et un échantillon dilué au 1/20^{ème} dans du méthanol est analysé par méthode UHPLC.

V. Résultats

1. Caractérisation des propriétés du PA

1.1. Evaluation *in vitro* de son activité inhibitrice de l'AChE et de la BuChE

La capacité du PA à inhiber l'activité de ces 2 enzymes a été déterminée *in vitro*, par spectrophotométrie, à partir de la méthode d'Ellman et de sa capacité à déplacer l'iodure de propidium lié à l'AChE (Tableau 8). Tandis qu'aucune activité inhibitrice significative n'est mise en évidence vis-à-vis de l'AChE, aussi bien au niveau du centre catalytique que de son site anionique périphérique, une activité submicromolaire vis-à-vis de la BuChE est observée. Le PA étudié présente ainsi une activité inhibitrice submicromolaire sélective de la BuChE, épargnant ainsi l'AChE.

Tableau 8 : Evaluation de l'activité inhibitrice de l'AChE et de la BuChE.

Molécule	(h)AChE IC₅₀ (nM) (n = 2)	(éq)BuChE IC₅₀ (nM) (n = 2)	% d'inhibition du déplacement de l'iodure de propidium (C=10⁻⁵ M) (n =2)
Donépézil	11 ± 3	2 ± 1	18 ± 1
PA	14 520 ± 1 485	573 ± 40	0 ± 1

1.2. Détermination de la perméabilité du PA à travers la BHE par méthode Pampa

La capacité du PA à diffuser de manière passive à travers un modèle de BHE (bicouche phospholipidique) a été évaluée par méthode Pampa. Le PA n'absorbant que très faiblement en UV, 2 solutions de travail ont été testées (20 et 75 mM). Dans les 2 cas, la perméabilité (Pe) est très faible (Tableau 9) et laisse supposer une faible propension du PA à franchir les barrières de l'organisme, probablement du fait de son caractère hydrophile.

Tableau 9 : Evaluation de la perméabilité par méthode Pampa.

Molécule	Pe (x10⁻⁶ cm/s)
Cortisone	20,2 ± 0,3
Théophylline	0,5 ± 0,0
PA 20 mM	0,0 ± 0,0
PA 75 mM	2,1 ± 0,3

2. Formulation et caractérisation des gels

2.1. Gels thermosensibles à base de poloxamère 407 (P407)

Le P407 est un composé largement utilisé pour la formulation de gels thermosensibles (123). Des équations ont même été proposées pour prédire la proportion à utiliser pour atteindre une $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ donnée (160). A titre d'illustration, les résultats théoriques attendus sont indiqués Figure 44. L'évolution de la température de gélification théorique est directement proportionnelle à la proportion de P407 utilisée.

Les premiers essais de formulation réalisés ont conduit à l'obtention de $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ inférieures à celles prédites, et ce de façon reproductible et indépendante de l'opérateur et des conditions de préparation des solutions de polymères (Figure 40). Avec moins de 14 % en P407, les solutions ne gélifient pas ; au-delà de 20 %, la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ devient inférieure à la température ambiante (20-22 °C). Entre 14 et 21 % en P407, des gels se forment entre 16 °C et 33 °C, avec un pH compatible pour une administration intranasale (pH ~ 6-7). Hormis à 14,25 % en P407, les $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ sont inférieures aux valeurs ciblées pour une gélification intranasale (32-35 °C).

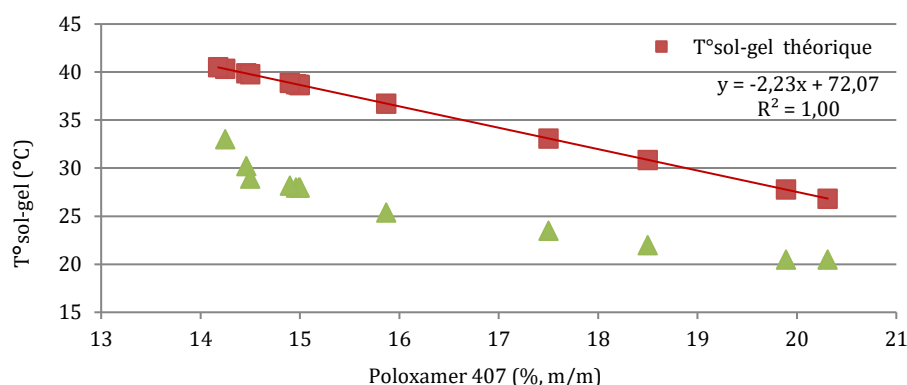


Figure 40 : $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ déterminée en fonction de la proportion en P407 par observation visuelle.

La $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ a par ailleurs été déterminée à partir des propriétés viscoélastiques des formulations (collaboration Pr Le Pluart, LCMT, Caen). Le régime linéaire du comportement rhéologique a tout d'abord été déterminé pour s'assurer que les réponses de contrainte de cisaillement variaient de façon proportionnelle avec les sollicitations de déformation de cisaillement (résultats non montrés) (109). La valeur de contrainte ayant été fixée à 25 Pa, les valeurs des modules élastique G' et visqueux G'' ont ensuite été mesurées. A titre d'illustration, la Figure 41 montre le comportement de la formulation contenant 17,5 % de P407.

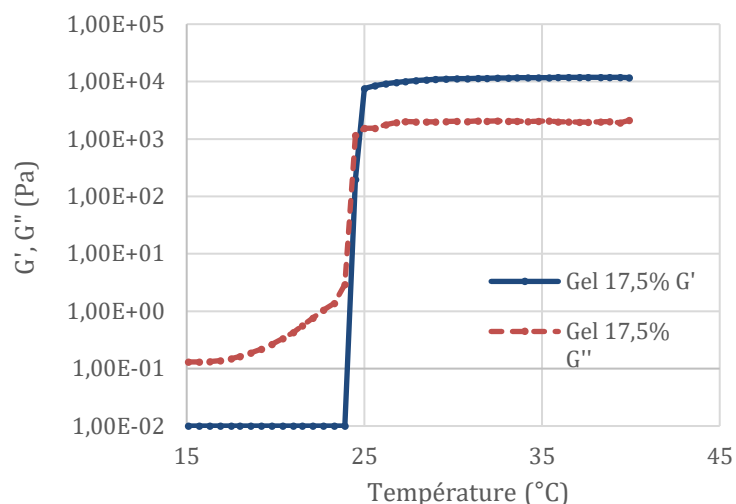


Figure 41 : Modules élastique G' et visqueux G'' d'un hydrogel contenant 17,5 % (m/m) de P407 avec une contrainte de cisaillement fixée à 25 Pa et une fréquence d'oscillation à 1 Hz.

A partir de 24,5 °C, G' devient supérieur à G'' , ce qui est caractéristique d'un gel. Cette valeur est comparable à la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ déterminée par observation visuelle (24,5 vs 23,5 °C) mais reste inférieure à celle référencée dans la littérature (33,1 °C). La cohérence des résultats ayant été confirmée pour d'autres hydrogels (résultats non montrés), la détermination visuelle de la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ a été poursuivie pour la suite des essais du diagramme ternaire.

2.2. Gels thermosensibles à base de P407 et de P188

Différentes proportions relatives en P407 et P188 ont été testées. Dans tous les cas, les solutions initiales étaient limpides à l'issue de procédé de solubilisation. Le pH de tous les gels était de ~ 6. Les valeurs d'osmolarité et de $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ obtenues sont montrées Figure 42 sous la forme d'un diagramme ternaire restreint à la zone d'intérêt explorée.

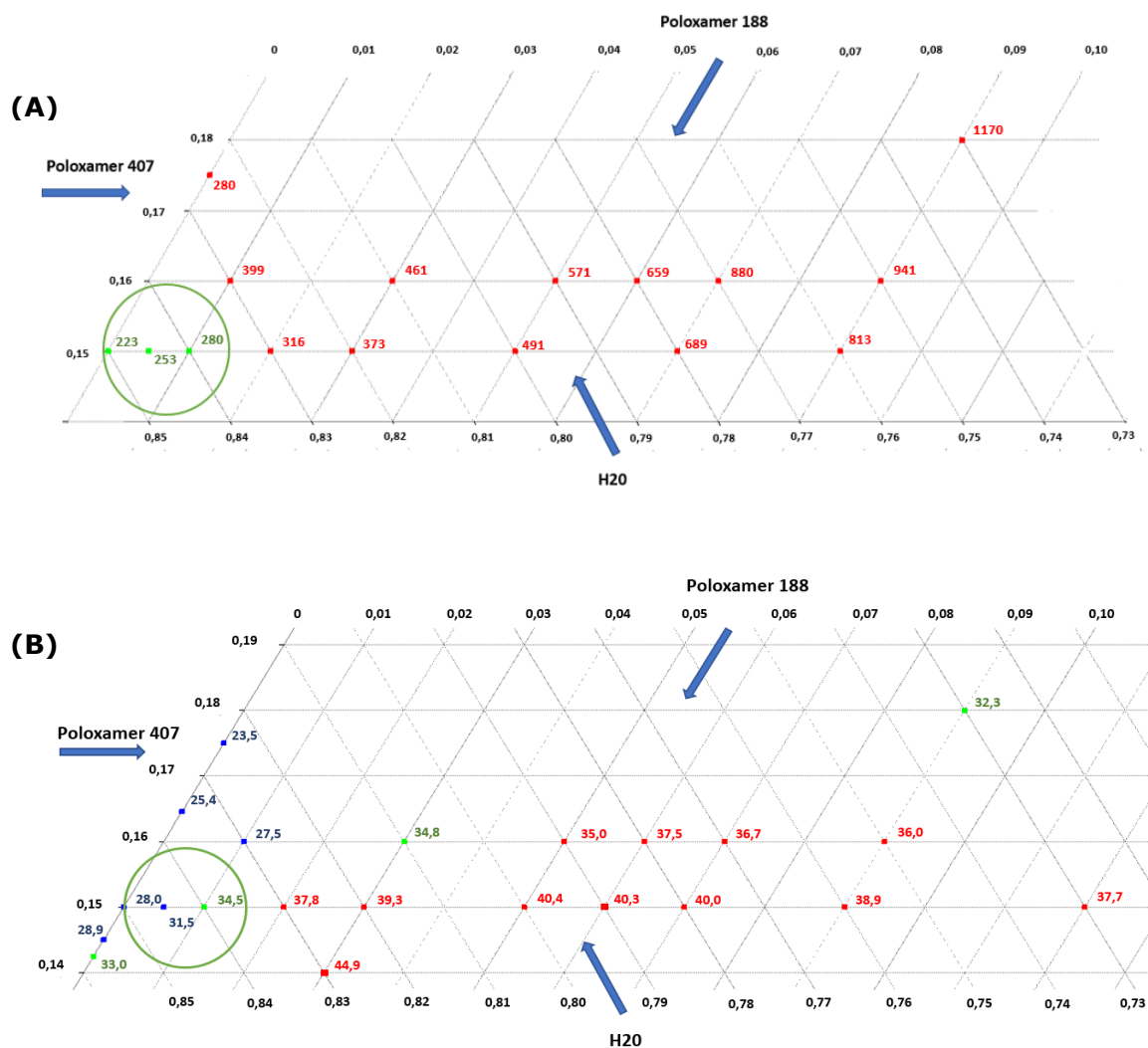


Figure 42 : Valeurs d'osmolarité (A) et de $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ (B) des formulations réalisées avec différentes proportions de P407/P188/eau (m/m).

Comme lorsqu'il est utilisé seul, le P407 montre une influence positive sur la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ et sur l'osmolarité. En présence de P188, la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ et l'osmolarité augmentent, ce, d'autant plus que sa proportion est importante dans le gel. A titre d'illustration la Figure 43 illustre à partir de l'analyse du rhéogramme, pour un gel de P407/188 15/1 (% , m/m) et dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment (contrainte de cisaillement fixe de 25 Pa et fréquence d'oscillation à 1 Hz), une inversion des modules élastiques G' et visqueux G'' semblable à celle observée pour un gel seul de P407. La $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ observée pour cet échantillon est de 35,1 °C, confirmant ainsi les résultats de $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ obtenus par la méthode visuelle.

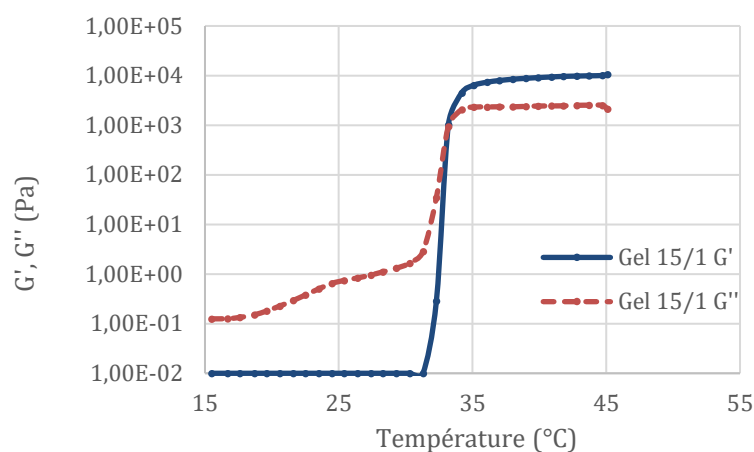


Figure 43: Modules élastiques G' et visqueux G'' d'un hydrogel de P407/188 15/1 (% m/m) avec une contrainte de cisaillement fixée à 25 Pa et une fréquence d'oscillation à 1 Hz.

À la vue de l'ensemble de ces résultats, c'est le mélange à 15 % en P407 et 1% en P188 (m/m) qui présente les caractéristiques les plus en adéquation avec le cahier des charges (Tableau 6). Après répétition des essais ($n=3$), les valeurs obtenues sont les suivantes :

- $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$	: $34,5 \pm 0,3$ °C	vs	[32-35 °C]
- osmolarité	: $277,3 \pm 3,8$ mOsm	vs	300 ± 20 mOsm
- pH	: 6 ± 0	vs	6 ± 3

2.3. Gels de poloxamères contenant le PA

Des formulations contenant un mélange P407/P188 15/1 (% m/m) ajouté à une proportion variable de PA (1 et 0,1 %, m/m) ont été réalisées en triplicat. Les $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ respectives des formulations contenant 0,1 et 1% de PA sont de $34,8 \pm 1,2$ et $34,9 \pm 0,7$ °C respectivement. Les valeurs d'osmolarité sont respectivement de 287 ± 6 et 351 ± 33 mOsmol. Le pH de toutes les solutions était situé entre pH 6 et 7. L'incorporation de PA dans le gel est donc envisageable mais la proportion de PA utilisée peut avoir un impact sur les valeurs d'osmolarité. Il faut donc en tenir compte dans la suite des expériences réalisées.

2.4. Incorporation de polymères mucoadhésifs dans des hydrogels à base de P407 et de P188

Des proportions croissantes (de 0 à 1 %, m/m) d'HPMC, de gomme gellane ou de chitosan ont été incorporés dans la formulation retenue P407/P188 15/1 (% m/m). L'impact de cet ajout sur les caractéristiques des formulations a été quantifié (Figure 44).

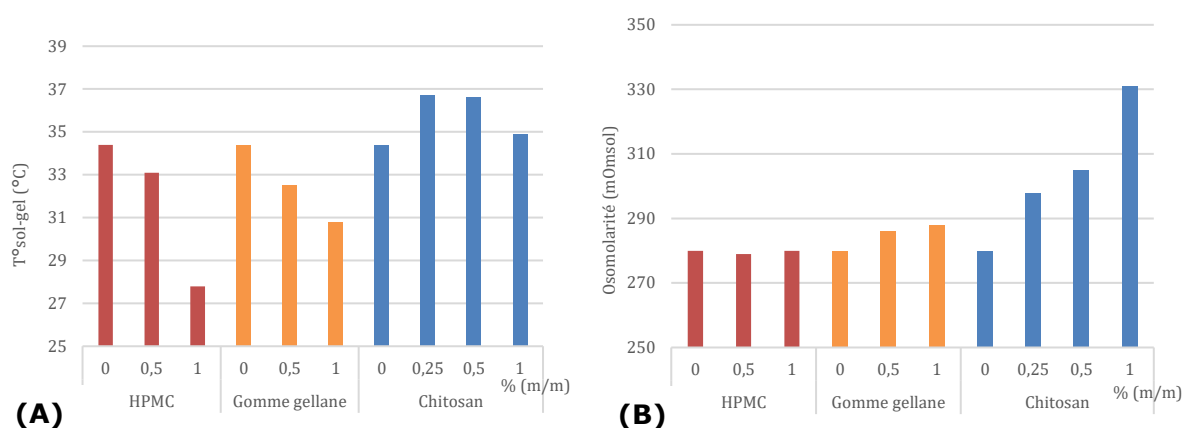


Figure 44 : Effets de l'ajout d'HPMC, gomme gellane ou chitosan en proportions variables sur la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ (A) et l'osmolarité (B) d'une solution de P407/188 15/1 (% m/m).

Dans tous les cas, la formation de gels sous l'effet de la température n'est pas empêchée. Tandis que l'ajout de gomme gellane n'impacte pas de façon préjudiciable les propriétés des formulations, l'ajout de quantités croissantes d'HPMC tend à diminuer la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ mais n'a pas d'impact sur l'osmolarité ni sur le pH (pH = 6 pour les formulations contenant 0,5 à 1 % de HPMC ou de gomme gellane, pH = 5 pour les formulations contenant 0,5 à 1 % de chitosan). L'ajout de chitosan conduit à une augmentation de la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ et de l'osmolarité et à une légère diminution du pH, laissant entrevoir la nécessité d'adapter les formulations futures le cas échéant.

3. Formulation et caractérisation de liposomes de principe actif

3.1. Caractérisation des propriétés granulométriques et de surface des liposomes

Les liposomes de PA ont été formulés par la méthode d'hydratation du film lipidique adaptée de celle décrite par Bangham. Certains facteurs ou étapes du protocole de préparation des liposomes ont été modifiés pour évaluer leur influence sur les caractéristiques des liposomes obtenus. Ainsi, il a été utilisé différents mélanges de lipides composés de phosphatidylcholine de soja (SPC) / cholestérol ou de phosphatidylcholine d'œuf (EPC) / cholestérol, utilisés à différentes concentrations (34, 60 ou 120 mM) et testés à différents ratios molaires (1:1 ou 8:1). Différents ratios PA/lipides ont également été testés. L'ensemble des résultats est visible en annexe. Globalement la valeur de PDI moyenne est de $0,050 \pm 0,010$, indiquant qu'une seule population de liposomes, monodisperse en taille, est présente dans tous les cas. Leur diamètre moyen est compris entre $105,3 \pm 0,3$ et $133,3 \pm 1,6$ nm. Les conditions de réhydratation ont été modulées, en faisant varier la température à laquelle la phase aqueuse est ajoutée (20 ou 40 °C) ainsi que la nature (vortex ou agitation magnétique) ou la durée d'agitation magnétique (de 30 minutes à 1h). Globalement, ces

différentes conditions n'influencent que très peu les propriétés granulométriques des liposomes formulés. L'origine de la phosphatidylcholine n'influence pas les propriétés granulométriques des liposomes. Il est à noter que les SPC et l'EPC ont une température de transition de phase de -20 et -8 °C respectivement. Dans les différentes conditions expérimentales, les phospholipides se trouvent donc en phase cristalline liquide. Le fait d'augmenter la proportion relative en cholestérol dans les ratios phospholipides/cholestérol impose d'utiliser une phase aqueuse à 40 °C pour favoriser la répartition homogène du cholestérol. De fait, ce sont les conditions opératoires qui ont été retenues pour la suite des expériences. La présence de PA ne se traduit pas par une variation marquée des propriétés des liposomes comme cela a pu être rapporté dans d'autres études (137). Les valeurs de potentiel ζ sont proches de la neutralité (de -5,0 à +2,9 mV), en cohérence avec la nature chimique des composés utilisés. Le procédé d'extrusion choisi n'entraîne pas de perte de PA puisque la proportion relative de PA retrouvé dans la suspension liposomale après extrusion est de $97,0 \pm 3,0$ %.

3.2. Encapsulation du PA dans les liposomes

3.2.1. Faisabilité de la séparation du PA encapsulé dans les liposomes du PA libre

Pour distinguer le PA libre du PA encapsulé, la méthode de séparation chromatographique par exclusion stérique sur colonne de SephadexTM a été utilisée. Chaque fraction a fait conjointement l'objet d'un dosage en PA par UHPLC et d'une détermination de la quantité en lipides à partir de l'analyse du nombre de coups (DCR method (158)). A titre d'illustration, les liposomes sont élués de la colonne dans les fractions 3 à 5, tandis que le PA libre l'est dans les fractions 8 à 11 (Figure 45). La quantification de l'ensemble des fractions de purification permet de retrouver en moyenne 94 ± 8 et 87 ± 13 % respectivement de lipides et du PA au total. Il est donc possible de quantifier les performances d'encapsulation.

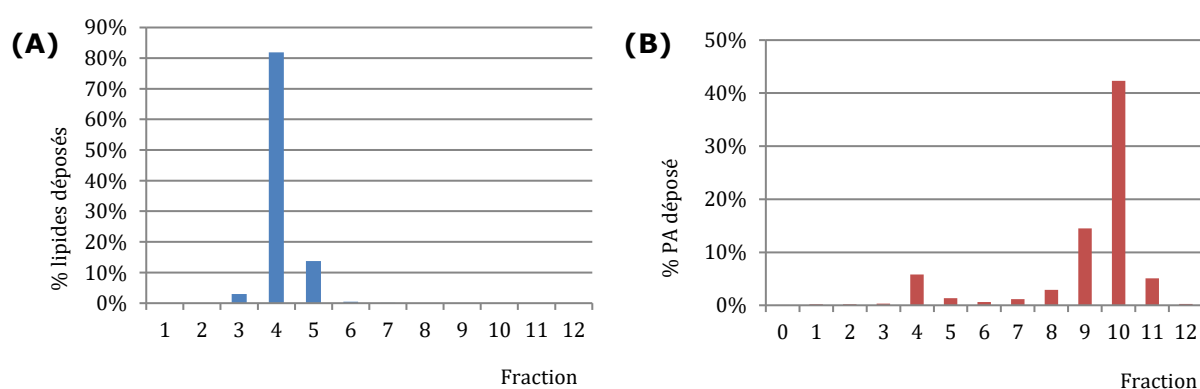


Figure 45 : Fractionnement des liposomes du lot Lipo-5 (dosés par détermination du nombre de coups) et du PA (dosé par UHPLC) après séparation sur colonne SephadexTM.

3.2.2. Caractérisation des performances d'encapsulation après mise en œuvre des techniques de séparation

Sous l'effet de la séparation sur colonne, les variations de taille ne sont pas significatives indiquant la bonne stabilité des liposomes. En revanche, une diminution significative non expliquée du potentiel ζ est constatée. Dans les différentes formulations testées, l'EE varie de 8 à 17,6 % mais si l'on tient compte de la masse initiale de PA, il apparaît que le ratio molaire lipides/PA de 5 :1 est plus favorable et a été retenu. L'EE augmente lorsque la concentration en lipides passe de 34 à 120 mM. Le fait d'utiliser des PC d'œuf ou de soja ne semble pas influencer les résultats. Au vu de l'ensemble des résultats, il a été décidé de conserver un procédé de formulation des liposomes à partir d'un mélange de SPC / cholestérol, de ratio molaire 8:1, une concentration en lipide de 120 mM et un ratio molaire de lipide / PA de 5:1 (Tableau 10). L'EE est satisfaisant au regard du cahier des charges et en particulier, de la quantité attendue de PA à délivrer (Tableau 6).

Tableau 10 : Propriétés d'encapsulation des liposomes après purification.

Liposomes encapsulant le PA	%EE	Concentration (mg/mL)
Post-purification	11,1 ± 1,0	1,1 ± 0,1

3.3. Formulation et caractérisation de différentes formulations

Différentes solutions à base de P407/188 15/1 (% , m/m) ont été formulés en solubilisant les polymères directement dans une solution de liposomes à base de 120 mM de SPC et de cholestérol (8:1), en absence ou en présence de PA (1 mg/mL). Les propriétés des formulations ainsi obtenues ont été caractérisées quant à leur $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$, leur osmolarité ainsi que leur valeur de pH. L'ensemble des résultats est inscrit dans le Tableau 11. La présence de liposomes à une concentration de 120 mM semble diminuer la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ du gel de référence (P407/188 15/1) de $34,5 \pm 0,3$ à $30,9 \pm 1,0$ °C. L'effet du PA sur ce paramètre est difficile à distinguer, même si ce dernier semble augmenter la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$. Il ne semble pas y avoir de modification importante d'osmolarité et de pH lors de l'ajout du PA et/ou des liposomes. Dans tous les cas, ces valeurs restent compatibles avec le cahier des charges initial pour l'administration de PA par voie intranasale (Tableau 6).

Tableau 11 : Résumé des principales propriétés d'une formulation adaptée à la voie intranasale et celles des gels formulés.

Propriétés	Optimum	P407/188 15/1 (% , m/m)	+ PA 1 mg/mL	+ liposomes	+ PA + liposomes
T _{sol-gel} (°C)	32-35	34,5 ± 0,3	34,8 ± 1,2	30,9 ± 1,0	32,6 ± 1,0
Osmolarité (mOsm/L)	280 ± 20	277 ± 4	287 ± 6	280 ± 5	293 ± 5
pH	6 ± 3	6,5	6,5	5,5	5,5

L'ensemble des résultats présentant les caractéristiques granulométriques et de surface des liposomes sont représentés dans le Tableau 12. L'ajout de poloxamères ne déstabilise pas les liposomes puisque, quelles que soient les proportions de liposomes ajoutées, une seule population monodisperse est présente. La présence de poloxamères engendre une légère augmentation du diamètre moyen des liposomes qui varie en fonction de la proportion relative de liposomes dans le gel. La présence de poloxamères ne provoque pas de modifications significatives du potentiel ζ .

Tableau 12 : Propriétés granulométriques et de surface des liposomes contenus dans les différentes formulations (n=3).

Formulation	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel ζ (mV)
Liposomes blancs	119,0 ± 0,7	0,032 ± 0,004	-5,5 ± 0,3
Liposomes encapsulant le PA	114,9 ± 2,4	0,048 ± 0,020	-11,2 ± 1,4
Liposomes blancs dans le gel	140,8 ± 0,5	0,078 ± 0,004	-6,6 ± 0,5

3.4. Etude des propriétés rhéologiques des hydrogels

L'analyse rhéologique de l'évolution de la viscosité selon le taux de cisaillement des comportements différents selon la composition de la formulation testée (Figure 46). Le gel de P407/188 15/1 (% , m/m) dispose de la viscosité la plus faible à 34 °C (98,1 Pa.s) et semble présenter des propriétés thixotropes, contrairement aux gels contenant des liposomes. Les formulations comprenant le gel de P407/188 15/1 (% , m/m) incorporant des liposomes (60 et 120 mM) présentent une viscosité supérieure au gel seul quelle que soit la vitesse de cisaillement. Pour les 3 échantillons une diminution de la viscosité est observée lorsque la vitesse de cisaillement augmente, traduisant un comportement rhéofluidifiant de ces gels.

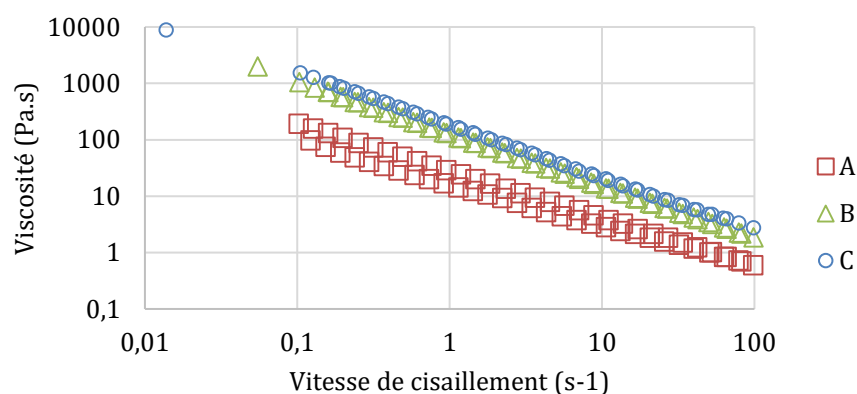


Figure 46 : Détermination de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement d'une formulation de P407/188 15/1 (% m/m) (A) + Liposome 60 mM (B) ou 120 mM (C).

Les rhéogrammes obtenus à 50°C sont typique d'un matériau gélifié. La valeur de G' est toujours supérieure à celle de G'' . Pour les 3 échantillons, le module élastique G' diminue et le module visqueux G'' augmente lorsque la contrainte d'oscillation augmente (Figure 47). Le module élastique G' augmente en présence de liposomes et cette augmentation est d'avantage marquée lorsque la concentration en liposomes augmente.

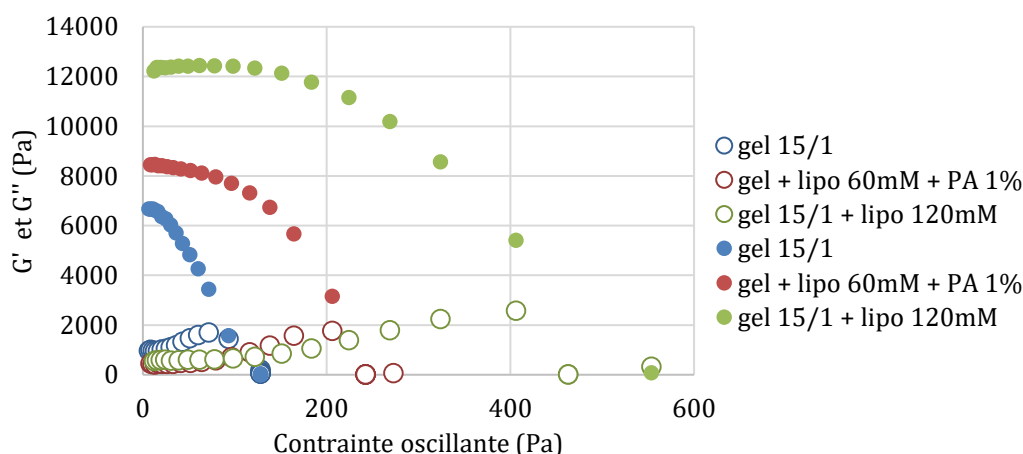


Figure 47 : Evaluation des modules G' (ronds pleins) et G'' (ronds vides) en fonction d'une contrainte oscillante croissante à 50 °C.

4. Etudes de mucoadhésion

Les performances de mucoadhésion à un disque de mucine de gels de P407/P188 15/1 (% m/m) formulés en absence ou en présence de 0,5 % de chitosan ou d'HPMC ou de liposomes (SPC : cholestérol (8 :1), 120 mM) ont été déterminées ($n=3$) (Figure 48). Par rapport au gel de référence, formulé à partir de poloxamères, ni le chitosan ni l'HPMC ne modifient significativement les paramètres d'adhésion. En revanche, l'utilisation de la solution liposomale conduit à un doublement de la force de détachement et à un triplement

du travail d'adhésion. Un contrôle des diamètres et des PDI des liposomes a été réalisé avant et après les analyses de texturométrie et n'a pas révélé de différence significative (résultats non montrés), attestant de la bonne stabilité des liposomes.

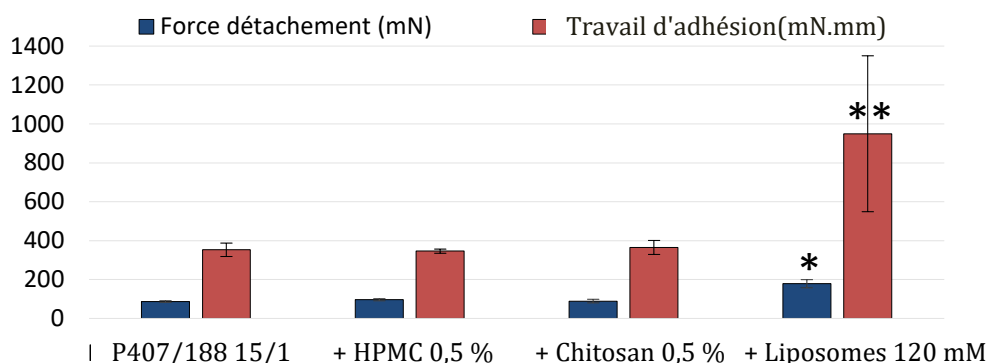


Figure 48 : Force de détachement et travail d'adhésion de différentes formulations (% , m/m, valeurs moyennes $\pm$ écart type, n=4 ; *VS 15/1 $p<0,01$; **VS 15/1 $p<0,001$).

5. Cinétiques de libération

Des études de cinétiques ont été réalisées pour étudier la diffusion du PA à travers une membrane de 100 kDa, utilisée comme membrane biomimétique sur cellule de Franz, à partir des différentes formulations développées: une solution mère de PA à 1 mg/mL (référence), une formulation à base de P407/188 15/1 (% , m/m) et de PA (1 mg/mL), une formulation liposomale (SPC/cholestérol 8:1, 120 mM) encapsulant le PA (1 mg/mL) et une formulation composite de gel de P407/188 15/1 (% , m/m) contenant des liposomes chargés en PA à 1 mg/mL. Chaque série d'expérience a été réalisée en doublon. Les cinétiques de libération sont montrées Figure 49.

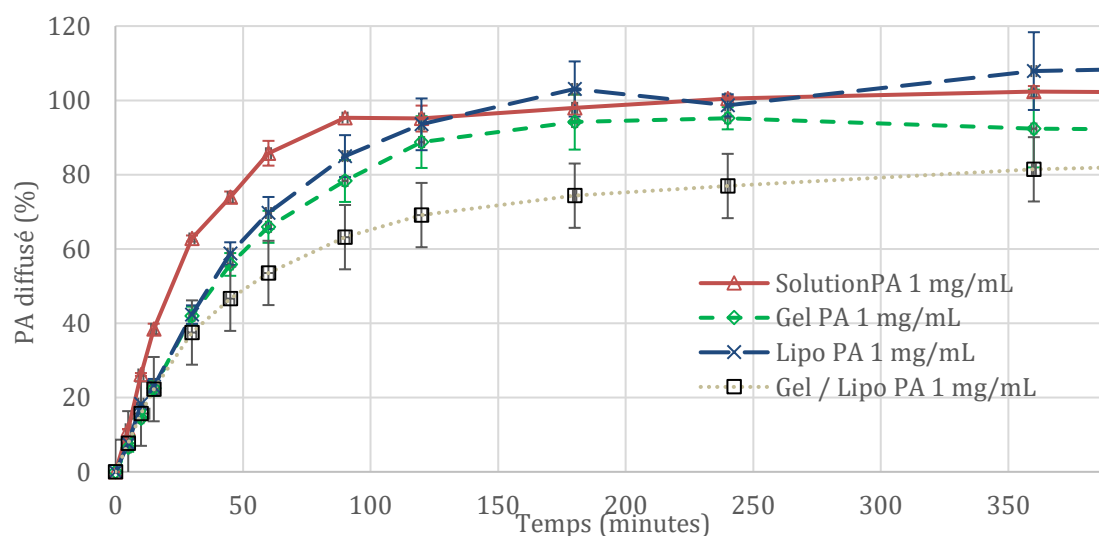


Figure 49 : Profils de diffusion cinétique de PA à 1 mg/mL dans différentes formulations d'intérêt (n=2).

Il est observé pour la solution de PA libre une diffusion du PA rapide vers le compartiment receveur, avec un $T_{50\%}$ (temps correspondant à 50 % de PA diffusé) à 20 minutes, et complète avec un $T_{100\%}$ (temps correspondant à 100 % de PA diffusé) aux alentours de 180 minutes. Les formulations de gel et de liposomes présentent un $T_{50\%}$ comparable de 40 minutes et une libération complète du PA à 180 minutes. La formulation composite présente un $T_{50\%}$ à 60 min. La majorité du PA a été libérée de la formulation composite après 360 min d'expérience (81,4 +/- 8 % de PA libéré). Il n'a pas été observé de modification des propriétés granulométriques et de surface des liposomes en fin de diffusion.

VI. Discussion

Les stades avancés de la MA sont caractérisés par une diminution de l'expression de l'AChE dans le SNC du fait de la neurodégénérescence, avec cependant le maintien ou l'augmentation progressive des niveaux de la BuChE cérébrale. Il a pu être établi expérimentalement que le PA étudié présente une activité inhibitrice submicromolaire de la BuChE tandis qu'il épargne l'AChE, aussi bien au niveau du centre catalytique que de son site périphérique. L'IC₅₀ du PA sur la BuChE équine (éq) a été évaluée à 573 nM, valeur du même ordre de grandeur que l'IC₅₀ de 119 nM sur BuChE (éq) rapportée dans la littérature pour ce PA (161). La BuChE (éq), de moindre coût que la BuChE humaine (h) est classiquement utilisée dans les tests *in vitro* (162,163). Il est à noter toutefois qu'il existe des différences structurales entre les BuChE éq et h qui peuvent s'accompagner de variations cinétiques dans l'hydrolyse de l'ACh, qui associées à des modes opératoires différents, peuvent conduire à une légère différence de résultats sur l'IC₅₀ (164). Comme l'IC₅₀ observée sur BuChE équine est souvent supérieure à l'IC₅₀ sur BuChE humaine (163), cela permet de penser qu'il sera possible d'obtenir une meilleure activité inhibitrice du PA étudié sur la BuChE (h) .

Le fait de disposer d'un inhibiteur sélectif de la BuChE est innovant car il n'existe pas à l'heure actuelle sur le marché de médicament équivalent. Le PA étudié pourrait donc, en inhibant la BuChE présente au niveau des neurones du SNC, avoir un rôle positif dans l'attention, la fonction exécutive, la mémoire émotionnelle et le comportement des patients atteints de MA à des stades avancés.

Le PA présente une bonne solubilité aqueuse (> 10 mg/mL). Pour déterminer sa capacité à atteindre le SNC, sa perméabilité a été déterminée expérimentalement par méthode PAMPA, approche couramment utilisée en screening haut débit (165). Il est à noter toutefois que cette méthode ne reflète que la diffusion passive du PA à travers une membrane biologique donnée (ici une membrane simulant la BHE). En effet cette méthode repose sur la détermination de la vitesse de diffusion d'une molécule à travers une couche de phospholipides dépourvue de transporteurs. Elle ne permet donc pas d'évaluer le passage actif, ni de prendre en considération d'éventuels effets des pompes à efflux (de type glycoprotéine P). Les modèles cellulaires permettent certes d'obtenir des résultats plus exhaustifs mais ils s'avèrent aussi plus complexes à mettre en place (166).

D'après les résultats expérimentaux obtenus, du fait de sa capacité limitée à diffuser à travers les membranes ($Pe \leq 2,1 \pm 0,3 \times 10^{-6}$ cm/s), le PA peut être considéré comme une molécule de classe III selon le système de classification biopharmaceutique (BCS) internationalement admis (167).

Pour présenter un réel intérêt thérapeutique dans les stades avancés de la MA, l'inhibition sélective de la BuChE doit intervenir au niveau central (7,10). En l'état, le PA administré par voie intraveineuse risque de ne pas atteindre le SNC. De plus, si sa distribution au niveau périphérique n'est pas contrôlée et empêchée, il pourrait engendrer des effets indésirables importants. En effet, la stimulation des récepteurs cholinergiques muscariniques périphériques entraîne notamment une toxicité cardiaque avec un effet chronotrope négatif (bradycardie), un effet dromotrope négatif (troubles de la conduction cardiaque), une vasodilatation artériolaire modérée (endothélium-dépendante par libération de monoxyde d'azote) (29).

Il convient donc de chercher à limiter la distribution du PA au niveau périphérique. De fait, une administration par voie intranasale du PA est apparue comme une voie d'administration intéressante. En effet, cette voie physiologique permet de court-circuiter la BHE puisqu'un PA administré dans la cavité intranasale peut atteindre directement le SNC, « du nez au cerveau » (*nose to brain*). Cette voie d'administration suscite actuellement un fort intérêt de la part de la communauté scientifique avec un total de 172 articles référencés pour des études *in vivo* dans la *database* de *Pubmed*, dont plus d'un tiers ont été publiés ces 3 dernières années (95). Divers PA vectorisés administrables par voie intranasale sont en cours d'essais cliniques pour le traitement de la MA. A titre d'exemple de l'insuline administrable par voie intranasale pour lutter contre la MA est actuellement en cours d'essai clinique en phase IV en Allemagne (168,169), de même que l'administration de neuropeptides protecteurs (phase II) (170). La voie intranasale peut être perçue comme une voie alternative valable aux voies orale ou parentérale pour l'administration de peptides et protéines car elle permet d'éviter l'effet de premier passage hépatique (171). La voie intranasale a donc été privilégiée car elle permet aussi une administration très peu invasive, indolore et utilisable en ambulatoire car facilement accessible. Elle est généralement associée à une bonne observance de traitement. Ainsi, dans le cadre de ce travail, nous avons recherché à produire une formulation adaptée aux recommandations de la pharmacopée européenne sur les préparations nasales, c'est-à-dire obtenir une formulation isotonique (280 ± 20 mOsmol) et possédant un pH approprié (6 ± 3) afin d'éviter au maximum toute toxicité locale (irritation) (104).

Nous avons cherché à développer une solution aqueuse du PA répondant à ces critères mais en y intégrant d'emblée la volonté d'avoir un temps de résidence augmenté dans la cavité nasale. Les hydrogels constituent un type particulièrement attrayant pour l'administration de PA par voie intranasale. Largement utilisés dans différents domaines médicaux (172–175), les hydrogels sont dénués de solvants organiques potentiellement toxiques puisqu'ils sont composés d'une grande quantité d'eau et d'un réseau de polymères réticulés. La teneur élevée en eau (généralement entre 70 et 99 %) offre une similitude

physique avec les tissus et peut conférer aux hydrogels une excellente biocompatibilité ainsi qu'une capacité d'inclusion facilitée pour les PA hydrophiles. Le réseau réticulé permet d'empêcher la pénétration de protéines extérieures. Il est ainsi admis que cette structure peut aider à la protection des PA de la dégradation prématurée par les enzymes extérieures (176). Les attributs mentionnés ci-dessus font des hydrogels des systèmes de matériaux attrayants pour l'administration d'un large éventail de PA. Certaines formulations peuvent gélifier *in situ* par l'intermédiaire de stimuli extérieurs (mécaniques ou chimiques). Les systèmes de gélification *in situ* sont apparus comme de nouvelles formulations utiles pour le traitement intranasal efficace des médicaments. Ils peuvent être facilement administrés sous forme de solutions, autorisant une administration d'une quantité précise de PA.

L'utilisation de poloxamères permet la création de formulations capables de gélifier *in situ* sous l'effet de la température, tout en étant compatibles avec la muqueuse nasale. Ces composés sont réputés comme étant non toxiques, biodégradables et biocompatibles après administration dans l'organisme (121). Ils restent inertes vis-à-vis de nombreux PA et autres excipients pharmaceutiques selon la *Food and Drug Administration*, ce qui leur a d'ores et déjà permis d'être intégrés à de nombreuses formulations galéniques pour les préparations pharmaceutiques et cosmétiques (ophtalmiques, orales, topiques, injectables,...) (177,178). Ils permettent de prolonger le temps de résidence du PA et potentiellement améliorer sa biodisponibilité. A titre d'exemple, il a été montré que l'administration d'un gel de P407 (26,5 %, m/m) permettait d'augmenter le temps de résidence d'un PA peptidique (opiorphine) de 5 heures au maximum dans la muqueuse nasale (179). Le P407 est l'un des poloxamères classiquement utilisés, seul ou en association, notamment le P188, afin de moduler la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ (180).

Expérimentalement, notre étude a montré que les formulations d'hydrogel à partir de P407 seul n'ont pu aboutir à une $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ compatible avec notre cahier des charges, ceci de façon étonnante et contrairement à certaines données empiriques de la littérature (109,160). D'après les données transmises par le fournisseur, il s'est avéré que le mode de production du P407 aurait évolué dernièrement modifiant ainsi le poids moléculaire moyen des poloxamères produits et entraînant une modification directe des $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ retrouvées expérimentalement. Cela est cohérent car pour aboutir à une gélification, les poloxamères doivent d'abord s'organiser sous forme de micelles et la concentration à laquelle cela se produit est directement corrélé aux proportions de PPO et PEO (cf partie I.C.1.2.2). Etant connu que le P188 présente quant à lui un effet positif sur la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ (123), des études de faisabilité ont été menées dans une zone restreinte d'un diagramme ternaire en intégrant à la fois le P407 et le P188. Elles ont montré que le mélange P407/188 15/1 (% , m/m) présente les caractéristiques les plus en adéquation avec notre cahier des charges, avec une $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ de 34,5°C, une osmolarité de 277 mOsmol et un pH de 6. L'analyse rhéologique

complémentaire de la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ de cette formulation montre bien une inversion des modules élastiques et visqueux illustrant l'obtention d'un gel thermosensible, et confirmant la valeur de sa $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ observée visuellement.

Le comportement rhéologique d'une formulation permet de caractériser les propriétés de déformation et d'écoulement des formulations. Il est apparu en complément des analyses de $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ que le gel de P407/188 15/1 (% , m/m) présente un effet possible thixotrope. La thixotropie est un effet transitoire qui permet de traduire la capacité des formulations testées à se liquéfier sous agitation constante, puis de se restructurer au repos. L'effet de thixotropie résulte de l'effet de déstructuration progressive du réseau tridimensionnel de l'hydrogel sous une action mécanique, puis d'une restructuration des liaisons inter moléculaires entre les poloxamères. Il apparaît par ailleurs que la formulation de P407/188 présente un comportement rhéofluidifiant.

Après avoir formulé un hydrogel thermosensible spécifique de la muqueuse nasale, il était intéressant de développer une structure nanoparticulaire capable d'encapsuler le PA d'intérêt afin d'empêcher sa dégradation et d'accroître sa stabilité (181). Ces systèmes permettent également de moduler la cinétique de libération du PA et sa biodistribution (182). Parmi la quasi infinité de nanovecteurs disponibles, nous avons décidé de développer des liposomes. Depuis qu'ils ont été décrits pour la première fois par l'hématologue anglais Alec Bangham en 1961 (142), les liposomes ont été reconnus et largement utilisés comme vecteurs d'administration de PA (183,184). Les liposomes sont des vésicules sphériques caractérisées par une bicouche de phospholipides avec une cavité aqueuse interne. Des PA de solubilité différentes y peuvent être encapsulés. Les PA hydrophobes ont une affinité pour la bicouche phospholipidique et les PA hydrophiles sont piégés dans la cavité aqueuse (185). Ces systèmes sont réputés comme étant non-toxiques, non-immunogènes, biocompatibles et biodégradables (183).

Expérimentalement, les liposomes de PA ont été formulés selon la méthode de Bangham. La méthode par hydratation d'un film mince est en effet celle qui est la plus largement utilisée. Du fait de sa solubilité, le PA a été dissous dans la phase aqueuse (142). Les liposomes produits ont ensuite été caractérisés d'un point de vue granulométrique, potentiel ζ et leur EE vis-à-vis du PA. Les variations de divers paramètres dans le procédé de formulation (ratio lipides, agitation mécanique, temps et type d'agitation ratio lipides / PA) n'entraînent pas de grandes variations sur les propriétés granulométriques et de surface des liposomes. Il a été décidé de retenir une formulation de liposomes à partir de 120 mM de SPC et de cholestérol dans un ratio 8:1 (m/m). Cette composition en lipides et le procédé de formulation permettent l'obtention de liposomes possédant des propriétés granulométriques satisfaisantes (diamètre $119,0 \pm 0,7$ nm, PDI $0,032 \pm 0,004$ et un potentiel ζ de $-5,5 \pm 0,3$ mv). Cette composition SPC/Chol est largement retrouvée dans la littérature et les propriétés granulométriques obtenues y sont comparables (178,186,187).

Des études portant sur la biodistribution après administration par voie intranasale de nanoémulsions de tailles différentes ont été réalisées. Elles concluent que les vecteurs ayant une taille de particule autour de 100 nm sont majoritairement transportés au niveau de la muqueuse olfactive ou de la voie trigémée, alors que les nanoémulsions de taille supérieure (> 200 nm) ne pouvaient pas diffuser *via* la voie olfactive (188). Ces résultats sont à tempérer sur la pertinence du modèle étudié et les études morphologiques de l'épithélium olfactif du mammifère choisi. Il a été observé que le diamètre moyen des axones olfactifs est d'environ 200 nm chez le rat, avec des diamètres inférieurs à 100 nm. Alors que chez l'homme les axones possèdent plutôt un diamètre compris entre 100 et 700 nm (189,190). Néanmoins cela permet de définir une contrainte de taille pour l'efficacité du transport transcellulaire des vecteurs *via* les axones olfactifs au SNC. Le diamètre des liposomes formulés lors de notre travail est de l'ordre de la 100^{aine} de nm et satisfait donc ce critère d'efficacité. L'effet du potentiel zêta sur les performances des vecteurs particuliers n'a pas encore été clairement élucidé. Des vecteurs chargés positivement peuvent potentiellement adhérer à la couche de mucus du fait d'interactions électrostatiques avec les protéines de mucines chargées négativement alors que des vecteurs neutres diffusent plus librement dans le mucus (191–193). Une étude récente démontre qu'aussi bien les vecteurs chargés positivement (cationiques) que négativement (anioniques) pouvaient diffuser dans le cerveau. Toutefois, les vecteurs anioniques diffuseraient vers le SNC principalement par la voie olfactive tandis que les vecteurs cationiques diffuseraient principalement par la voie du nerf trijumeau (189). La formulation des liposomes blancs issus de notre travail produit des vecteurs avec des charges de surface proches de la neutralité et très légèrement négatives (potentiel $\zeta = -5,5 \pm 0,3$ mV), de même qu'en présence de PA encapsulé (potentiel $\zeta = -11,2 \pm 1,4$ mV). De fait, au vu des propriétés granulométriques et de surface des liposomes ainsi formulés, les prérequis pour permettre l'adressage et la diffusion du PA vers la muqueuse olfactive semblent plutôt satisfaits.

Les recherches menées sur l'encapsulation de PA en vue d'une administration intranasale doivent développer des systèmes particuliers capables d'avoir de grandes capacités d'encapsulation vis-à-vis du PA. Cet objectif commun est lié au faible volume de formulation administrable qu'autorise la voie intranasale (volume maximal chez l'homme est de 0,4 mL) (194). Il est très difficile de pouvoir quantifier les performances d'encapsulation d'un vecteur quand il s'agit d'un PA hydrophile car sa fraction libre doit être séparée du véhicule alors qu'il a une affinité pour le milieu de dispersion. Nous avons pu démontrer que la méthode séparative choisie (chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Sephadex™) pour l'obtention de liposomes purifiés, n'induit pas de déstabilisation des liposomes. Le diamètre moyen des liposomes et les contrôles DCR restant inchangés après l'étape de purification (diamètre = $114,9 \pm 2,4$ nm, PDI = $0,048 \pm 0,020$ et potentiel $\zeta = -11,2$

$\pm 1,4$ mv). Associée à une quantification des liposomes par détermination du nombre de coups (DCR method), elle permet d'obtenir des bons taux de recouvrement et donne des résultats reproductibles. Toutefois, une dilution des échantillons est induite au cours de l'étape d'élution sur colonne. C'est pourquoi, les échantillons peuvent être reconcentrés par filtration-centrifugation sur filtre Amicon®. Il est alors possible d'atteindre systématiquement des concentrations en PA équivalentes à 1 mg/mL.

L'augmentation de la proportion en cholestérol dans les liposomes, conduit à une augmentation moyenne ($n=3$) du diamètre moyen des liposomes de 15 nm. Cependant, contrairement à l'étude de Taylor *et al.* sur des MLV cette augmentation de diamètre induite par le cholestérol ne s'accompagne pas d'amélioration du taux d'encapsulation (195). L'origine de la PC peut influencer le taux d'encapsulation. Le remplacement de SPC par du EPC peut dans certains cas améliorer la capacité d'encapsulation des liposomes (196). Dans notre étude, aucune différence n'a été observée. Les travaux de Xu *et al.* ont montré que les principaux facteurs influençant le taux d'encapsulation dans des liposomes sont la concentration en lipides et la concentration en PA (197). Les travaux de Xu *et al.* (198) ont mis en évidence que l'augmentation du TE avec l'augmentation de la concentration de lipides pouvait être liée à l'augmentation du volume aqueux internalisé dans les liposomes. De plus, il a été démontré que l'augmentation de la teneur en lipides dans le gel s'opposait à des phénomènes de percolation. A l'issue du procédé de formulation que nous avons développé, nous obtenons une solution liposomale avec une teneur en PA encapsulé équivalente à 1 mg/mL. Cette concentration en PA semble être satisfaisante en attendant de déterminer la quantité de PA à administrer.

La réalisation d'une formulation composite à partir de la combinaison d'un gel de P407/188 15/1 (% , m/m) et des liposomes chargés en PA retenus précédemment permet l'obtention d'une formulation ayant une $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ de 32,6°C, une osmolarité de 293 mOsmol et un pH de 5,5. Cette formulation composite satisfait donc à notre cahier des charges initial. Les liposomes inclus dans ce gel possèdent un diamètre de $140,8 \pm 0,5$ nm et un potentiel ζ de $-6,6 \pm 0,5$ mV. Cette augmentation du diamètre moyen des liposomes inclus dans le gel de P407/188 pourrait suggérer une interaction entre les poloxamères et les lipides.

Des études ont montré que le P407 pouvait être intégré à la formulation des liposomes mais que cela pouvait induire une fuite de la sonde fluorescente hydrophile encapsulée dans les nanovecteurs. Cette incorporation pourrait, dans certains cas, favoriser la formation de pores, de fractures ou de régions de grande fluidité conduisant à la libération progressive du PA. Les interactions poloxamères-liposomes n'ont pas conduit à des fuites de PA dans notre cas.

L'hypothèse d'une interaction liposomes-poloxamères est par ailleurs objectivée par une modification du comportement rhéologique du gel formulé en présence de liposomes et également une augmentation de la mucoadhésion observée par texturométrie.

En effet, le comportement rhéofluidifiant des formulations est plus marqué en présence de quantités croissantes de liposomes. Cette propriété pourrait s'avérer utile bien plus tard lors du développement d'un dispositif pour pulvérisation nasale afin de permettre l'instillation efficace et aisée de la formulation dans la cavité intranasale. Cette observation n'est que peu retrouvée dans la littérature. A titre d'exemple, Mura *et al.* rapportent que la présence de liposomes ne modifient pas les propriétés rhéologiques de leur gel (179). Cependant les gels formulés dans cette étude ne sont formulés qu'à partir de P407 et d'un excipient mucoadhésif. Des interrogations restent donc en suspens comme la façon dont les liposomes s'intègrent dans le réseau tridimensionnel de P407/188 et les changements d'interactions que cela induit entre les poloxamères eux-mêmes. Des éléments de réponse sont apparus comme l'augmentation du diamètre des liposomes en présence de poloxamères ($140,8 \pm 0,5$ nm *versus* $119,0 \pm 0,7$ nm) qui peut laisser à penser qu'une adsorption des poloxamères à la surface des liposomes est envisageable. Les études de viscosité ont pu confirmer qu'à 25°C la formulation sous forme de solution possédait une faible viscosité (137 mPa.s) comparée à la forme gel (sans et avec liposomes) à 34 °C (864 et 35 1033 Pa.s). Ce paramètre permet d'illustrer une fois de plus le changement d'état qui s'opère au sein de la formulation lorsque la température augmente. Cette seule valeur de viscosité mesurée représente la viscosité dynamique et ne saurait faire preuve de la viscosité réelle de la formulation, du fait du comportement rhéofluidifiant de la formulation composite. La viscosité réelle devra donc être mesurée par la suite et être mise en parallèle des études de toxicité et histologiques afin de confirmer si celle-ci s'inscrit bien dans notre optimum recherché (12 ± 2 Pa.s).

Les études de diffusion du PA dans le milieu nasal simulé sur cellules de Franz ont permis de comparer les cinétiques de diffusion du PA à partir des différentes formulations. Le PA diffuse naturellement moins vite vers le compartiment accepteur que lorsqu'il est compris dans le gel de poloxamères ou encapsulé dans les liposomes. Il ne semble pas exister de différences significatives entre la libération de PA contenu dans le gel ou encapsulé dans les liposomes. Lorsque le PA est contenu dans la formulation composite (gel + liposome), la libération et diffusion du PA est retardée. Il a été démontré que l'incorporation des liposomes dans un hydrogel permet de favoriser une libération prolongée du PA encapsulé entraînant une augmentation du temps de résidence du PA au niveau du site d'administration (199,200). Cette étude nous a permis ainsi de mettre en évidence l'influence de la forme galénique et celle des liposomes sur la diffusion du PA. D'après nos observations de cinétique *in vitro*, le PA peut donc diffuser selon des cinétiques très

différentes selon la formulation choisie ($T_{50\%}$ à 20 min pour le PA libre et 60 min pour le PA encapsulé dans les liposomes contenus dans un gel).

Le transport paracellulaire au niveau de la muqueuse olfactive semble être la voie majoritaire de diffusion de PA avec une diffusion vers le SNC en moins de 30 min, alors que les autres voies ont un temps de diffusion de quelques heures à plusieurs jours (189,201). Cela pourrait s'expliquer par une régénération lente des neurones olfactifs et la présence de neurones matures et nouvellement formés qui modifierait la composition en jonctions serrées de l'épithélium olfactif à certains endroits, ce qui faciliterait le passage de PA par la voie paracellulaire.

Les expériences à venir *in vivo* permettront de déterminer la voie de diffusion utilisée et l'influence du type de formulation (solution, gel, liposomes ou formulation composite) sur la diffusion du PA vers le SNC. Ces expériences à mener en parallèle de celles destinées à évaluer la quantité de PA à délivrer dans le SNC pour l'obtention d'un effet thérapeutique et celles visant à démontrer la preuve de concept d'efficacité du PA, permettront de définir la formulation optimale à utiliser. Nous disposons d'ores et déjà d'un éventail de formulations permettant de moduler et maîtriser la vitesse et la quantité de PA à délivrer. De plus si cela est nécessaire, la vitesse de libération peut également être modulée par la composition des liposomes. En effet, une proportion plus importante en cholestérol peut permettre de ralentir, si nécessaire, la libération de PA (202).

Cependant, en tout état de cause, bien qu'améliorée par rapport à la voie intraveineuse, la biodisponibilité centrale d'une molécule après administration intranasale reste modeste (<1 %) (203,204). En outre, la diffusion de PA vers le SNC à partir d'une telle formulation n'est efficace que lorsque celle-ci reste en contact avec l'épithélium olfactif assez longtemps pour que le PA puisse diffuser *via* la voie olfactive, tout en s'affranchissant de la clairance nasale et du mouvement ciliaire. Les propriétés thermosensibles du P407 ont été largement exploitées dans le développement de gels nasaux *in situ* (205). Contrairement au P188, le P407 est plutôt décrit comme ayant une mucoadhésion limitée (206). Il est donc apparu intéressant d'intégrer à la formulation un polymère fortement mucoadhésif afin d'augmenter les interactions entre le gel et la muqueuse nasale (123). Le chitosan, l'HPMC et la gomme gellane sont très largement décrits comme des excipients mucoadhésifs susceptibles d'être incorporés dans un gel afin d'en augmenter les propriétés de mucoadhésion. Leur addition peut favoriser *in fine* la diffusion du PA vers le SNC. Par exemple certains auteurs ont signalé que la co-administration par voie intranasale d'un facteur de croissance neuronal (NGF) associé à du chitosan (0,25 %, m/m) multiplie par 10 sa biodisponibilité dans le SNC (207,208). Le chitosan permet d'augmenter l'hydrophilie de surface des nanovecteurs, et de fait, permet de prolonger de manière significative leur temps de rétention au niveau de la muqueuse olfactive (189). D'autres équipes ont pu augmenter

les forces bioadhésives d'une formulation de P407/188 en ajoutant de l'HPMC (<1 %, m/m) (180).

Dans le cadre de nos études, il est apparu que l'ajout d'excipients (HPMC, chitosan, gomme gellane), aux concentrations choisies (0,5 %, m/m) n'affecte pas de façon significative la $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$. Considérant qu'une fois formé dans la cavité intranasale, le gel devra avoir un temps de résidence permettant une libération optimale du PA, la capacité de différentes formulations à adhérer à un disque de mucine a été évaluée avec un texturomètre. En effet, la muqueuse olfactive est recouverte d'une couche de mucus de 5 à 10 μm constituant un gel visco-élastique constitué à 95 % d'eau, de protéines et de glycoprotéines, la mucine en particulier (153). L'analyse des forces de mucoadhésion ne montre pas d'effet notable des excipients ajoutés à la solution de P407/188 15/1 (% , m/m) alors qu'ils sont pourtant réputés comme ayant des propriétés mucoadhésives, (124). En effet les études de mucoadhésion réalisées durant ce travail n'ont pas mis en évidence de différence significative sur la force de détachement et le travail d'adhésion entre le gel de contrôle et des gels contenant des excipients mucoadhésifs (gomme gellane, HPMC ou chitosan). En revanche, l'introduction des liposomes dans un gel de poloxamères conduit de façon inattendue à une mucoadhésion plus efficace.

La capacité de mucoadhésion du gel de référence P407/188 15/1 (% ,m/m) et celle de la formulation composite seront évaluées *in vivo* pour juger de leur efficacité dans la diffusion du PA. L'incorporation de concentrations intermédiaires d'excipients mucoadhésifs pourront être retestés pour optimiser si nécessaire la formulation, qui pourrait déjà en l'état faire l'objet d'études biologiques.

VII. Conclusion / Perspectives

Le composé étudié semble constituer un PA d'intérêt symptomatique et curatif dans la MA. La preuve de concept sera réalisée à partir d'études *in vivo* très prochainement après administration intrathécale d'une solution de ce PA. Cette voie d'administration ne pouvant être utilisée en routine, une alternative doit être trouvée. Au cours de ce travail, un hydrogel thermosensible à base de P407 et de P188, véhiculant le PA d'intérêt, compatible avec une administration par voie intranasale, a été développé. La formulation choisie se présente sous la forme d'une solution qui est capable de gélifier une fois introduite dans la cavité intranasale. Cette gélification *in situ* est déclenchée par l'augmentation de la température à l'intérieur de la cavité nasale. Ce gel devra permettre un relargage progressif du PA vers le SNC, majoritairement par le biais de la voie olfactive. En outre, le PA peut être encapsulé dans des liposomes. La validation du protocole de formulation des liposomes et des processus de purification et de caractérisation (propriétés granulométriques, EE) ont permis de montrer que les liposomes formulés sont capables d'encapsuler efficacement, en concentration maîtrisée, le PA. Leurs caractéristiques granulométriques et leur charge de surface les rendent propices à une diffusion olfactive vers le SNC. Il a été montré que l'incorporation des liposomes dans le gel n'en modifie pas les propriétés de $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ et permet de conserver des valeurs d'osmolarité et de pH compatibles avec l'instillation nasale. Le comportement rhéofluidifiant de la formulation composite pourrait de plus s'avérer être un avantage lors de futurs essais d'administration par pulvérisation à partir d'un dispositif dédié. De plus, la formulation composite semble posséder naturellement une mucoadhésion suffisamment importante qui permettrait d'obtenir une rémanence intranasale satisfaisante lors d'une prochaine administration *in vivo*. Il a été montré que l'ensemble des formulations développées permettait une libération modulée et contrôlée du PA vers le SNC.

Des expériences *in vivo* restent à mener pour évaluer le comportement des formulations développées, en particulier leur toxicité. Ainsi, des études anatomopathologiques et histologiques seront nécessaires dans le cas d'une administration par voie intranasale des formulations (209). La modélisation théorique des profils de libération telle que présentée reste un premier élément de réponse sur la mise à disposition du PA. Cependant, la réalisation d'études biologiques *in vivo* permettra une compréhension approfondie de la libération et du transport du PA à travers les tissus de la membrane olfactive vers le SNC.

En conclusion, ce travail a permis de développer et caractériser une formulation galénique composite et innovante constituée d'un gel thermosensible, doué de propriétés mucoadhésives et véhiculant des liposomes d'un PA prometteur pour le traitement de la MA. L'ensemble de la formulation est indiqué et compatible pour une administration par voie

intranasale, voie particulièrement intéressante pour une prise en charge ambulatoire des patients souffrant de cette maladie neurodégénérative majeure et ne possédant pas de traitement curatif jusqu'à ce jour.

VIII. Bibliographie

1. Lecoutey C, Hedou D, Freret T, Giannoni P, Gaven F, Since M, et al. Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Sep 9;111(36):E3825-3830.
2. Gloaguen C, Voisin-Chiret AS, Sopkova-de Oliveira Santos J, Fogha J, Gautier F, De Giorgi M, et al. First evidence that oligopyridines, α -helix foldamers, inhibit Mcl-1 and sensitize ovarian carcinoma cells to Bcl-xL-targeting strategies. *J Med Chem*. 2015 Feb 26;58(4):1644–68.
3. World Alzheimer Report 2015
<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015-sheet.pdf>
4. Buée L, Delacourte A. La maladie d'Alzheimer : une tauopathie parmi d'autres ? *médecine/sciences*. 2002 Jun 1;18(6–7):727–36.
5. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999 Feb;66(2):137–47.
6. Cherif O, Allouche F, Chabchoub F, Chioua M, Soriano E, Yañez M, et al. Isoxazolotacrines as non-toxic and selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Future Med Chem*. 2014 Nov 1;6(17):1883–91.
7. Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Feb;4(2):131–8.
8. Quraishi MS, Jones NS, Mason J. The rheology of nasal mucus: a review. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1998;23(5):403–413.
9. Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2000 Jul;50(1):27–46.
10. Jacqmin-Gadda H, Alperovitch A, Montlahuc C, Commenges D, Leffondre K, Dufouil C, et al. 20-Year prevalence projections for dementia and impact of preventive policy about risk factors. *Eur J Epidemiol*. 2013 Jun;28(6):493–502.
11. Camicioli R. Distinguer les différents types de démences. *Rev Can Mal D'Alzheimer Autres Démence*. 2006;8(4):4–11.
12. Paterson C. World Alzheimer Report 2018 <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf>
13. Dartigues JF, Gagnon M, Michel P, Letenneur L, Commenges D, Barberger-Gateau P, et al. [The Paquid research program on the epidemiology of dementia. Methods and initial results]. *Rev Neurol (Paris)*. 1991;147(3):225–30.
14. Carcaillon-Bentata L. Peut-on estimer la prévalence de la maladie d'Alzheimer et autres démences à partir des bases de données médico-administratives ?

Comparaison aux données de cohortes populationnelles.
http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2016/28-29/pdf/2016_28-29_1.pdf

15. Gallez C, Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées au nom de l'Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé
<http://www.assemblee-nationale.fr/12/rap-off/i2454.asp>
16. Espérance de vie - Mortalité – Tableaux de l'économie française | Insee
<https://www.insee.fr/fr/statistiques/3303354?sommaire=3353488>
17. Bérard A, Gervès C, Aquino J-P. Combien coûte la maladie d'Alzheimer ? :98.
18. Annexe rapport d'évaluation des médicaments https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016-10/annexe_-_rapport_devaluation_des_medicaments.pdf
19. Graham NL, Emery T, Hodges JR. Distinctive cognitive profiles in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 Jan;75(1):61–71.
20. Helmes E, Østbye T. Beyond memory impairment: cognitive changes in Alzheimer's disease. *Arch Clin Neuropsychol*. 2002;17(2):179–193.
21. Jacobs DM, Sano M, Dooneief G, Marder K, Bell KL, Stern Y. Neuropsychological detection and characterization of preclinical Alzheimer's disease. *Neurology*. 1995 May;45(5):957–62.
22. Price AR, Xu G, Sieminski ZB, Smithson LA, Borchelt DR, Golde TE, et al. Comment on "ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models." *Science*. 2013 May 24;340(6135):924-d.
23. Senanarong V, Cummings JL, Fairbanks L, Mega M, Masterman DM, O'Connor SM, et al. Agitation in Alzheimer's disease is a manifestation of frontal lobe dysfunction. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2004;17(1–2):14–20.
24. Chen J-Y, Stern Y, Sano M, Mayeux R. Cumulative Risks of Developing Extrapyrimal Signs, Psychosis, or Myoclonus in the Course of Alzheimer's Disease. *Arch Neurol*. 1991 Nov 1;48(11):1141–3.
25. Hart DJ, Craig D, Compton SA, Critchlow S, Kerrigan BM, McIlroy SP, et al. A retrospective study of the behavioural and psychological symptoms of mid and late phase Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2003 Nov;18(11):1037–42.
26. Les stades de la maladie d'Alzheimer | Société Alzheimer du Canada
<http://alzheimer.ca/fr/Home/About-dementia/Alzheimer-s-disease/Stages-of-Alzheimer-s-disease>
27. Shulman KI. Clock-drawing: is it the ideal cognitive screening test? *Int J Geriatr Psychiatry*. 2000 Jun;15(6):548–61.

28. "Les 5 mots", épreuve simple et sensible pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer - EM|consulte. /data/revues/07554982/00310036/1696/<https://www.em-consulte.com/en/article/93020>
29. Gélinas I, Gauthier L, McIntyre M, Gauthier S. Development of a functional measure for persons with Alzheimer's disease: the disability assessment for dementia. *Am J Occup Ther Off Publ Am Occup Ther Assoc.* 1999 Oct;53(5):471–81.
30. Tombaugh TN, McIntyre NJ. The mini-mental state examination: a comprehensive review. *J Am Geriatr Soc.* 1992 Sep;40(9):922–35.
31. Ruchinskas RA, Curyto KJ. Cognitive Screening in Geriatric Rehabilitation. :10.
32. M. Crum R, C. Anthony J, Bassett S, F. Folstein M. Crum RM, Anthony JC, Bassett SS, et al: Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and education level. *JAMA* 269: 2386-2391. Vol. 269. 1993. 2386 p.
33. Frisoni GB, Geroldi C, Beltramello A, Bianchetti A, Binetti G, Bordiga G, et al. Radial width of the temporal horn: a sensitive measure in Alzheimer disease. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2002 Jan;23(1):35–47.
34. Les marqueurs biochimiques du LCR : un outil diagnostique de la maladie d'Alzheimer. | Base documentaire | BDSP <http://www.bdsp.ehesp.fr/Base/355209/>
35. Schraen-Maschke S, Dhaenens CM, Bombois S, Deramecourt V, Brussel EV, Obriot H, et al. Les marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer : quel intérêt pour un diagnostic moins tardif ? <https://www.em-consulte.com/en/article/208467>
36. Hippus H, Neundörfer G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci.* 2003 Mar;5(1):101–8.
37. Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jun;85(11):4051–5.
38. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jul;83(13):4913–7.
39. Kidd M. Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease. *Nature.* 1963 Jan;197(4863):192–3.
40. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 May;72(5):1858–62.
41. Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between

- PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*. 1993 Jul;11(1):153–63.
42. Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1991;82(4):239–59.
 43. Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging*. 1995 Jun;16(3):271–8; discussion 278-284.
 44. Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Ito H, Kameyama M, et al. Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Dec 29;165(3):1406–14.
 45. Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, et al. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*. 1999 Apr;90(1):1–13.
 46. Dumery L, Bourdel F, Soussan Y, Fialkowsky A, Viale S, Nicolas P, et al. beta-Amyloid protein aggregation: its implication in the physiopathology of Alzheimer's disease. *Pathol Biol (Paris)*. 2001 Feb;49(1):72–85.
 47. Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, et al. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*. 1990 Jun 1;248(4959):1122–4.
 48. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 1999 Oct 22;286(5440):735–41.
 49. Les plaques amyloïdes — Site des ressources d'ACCES pour enseigner la Science de la Vie et de la Terre <http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/neurosciences/actualisation-des-connaissances/maladies-et-traitements/alzheimer/la-maladie-dalzheimer-a-lechelle-cellulaire-et-moleculaire/les-palques>
 50. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992 Apr 10;256(5054):184–5.
 51. Karran E, Mercken M, Strooper BD. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Sep;10(9):698–712.
 52. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 2002 Jun 25;58(12):1791–800.
 53. Mann DM, Marcyniuk B, Yates PO, Neary D, Snowden JS. The progression of the pathological changes of Alzheimer's disease in frontal and temporal neocortex examined both at biopsy and at autopsy. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1988 Jun;14(3):177–95.

54. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Aug 16;122(3):1131–5.
55. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Zeitschrift für Psychiatrie und Physisch-Gerichtliche Medizin.* 1907;146–8.
56. Permanne B, Perez C, Soto C, Frangione B, Wisniewski T. Detection of Apolipoprotein E/Dimeric Soluble Amyloid β Complexes in Alzheimer's Disease Brain Supernatants. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Nov 26;240(3):715–20.
57. Snow AD, Wight TN. Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses. *Neurobiol Aging.* 1989 Oct;10(5):481–97.
58. Stoltenberg M, Bruhn M, Søndergaard C, Doering P, West MJ, Larsen A, et al. Immersion autometallographic tracing of zinc ions in Alzheimer beta-amyloid plaques. *Histochem Cell Biol.* 2005 Jul;123(6):605–11.
59. Collingwood JF, Chong RKK, Kasama T, Cervera-Gontard L, Dunin-Borkowski RE, Perry G, et al. Three-dimensional tomographic imaging and characterization of iron compounds within Alzheimer's plaque core material. *J Alzheimers Dis JAD.* 2008 Jun;14(2):235–45.
60. Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol.* 1981 Aug;10(2):122–6.
61. Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science.* 1983 Mar 11;219(4589):1184–90.
62. Court JA, Perry EK. Dementia: The neurochemical basis of putative transmitter orientated therapy. *Pharmacol Ther.* 1991 Dec 1;52(3):423–43.
63. Sims NR, Bowen DM, Allen SJ, Smith CC, Neary D, Thomas DJ, et al. Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. *J Neurochem.* 1983 Feb;40(2):503–9.
64. Perry EK, Perry RH, Gibson PH, Blessed G, Tomlinson BE. A cholinergic connection between normal aging and senile dementia in the human hippocampus. *Neurosci Lett.* 1977 Oct;6(1):85–9.
65. DeKosky ST, Harbaugh RE, Schmitt FA, Bakay RA, Chui HC, Knopman DS, et al. Cortical biopsy in Alzheimer's disease: diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations. Intraventricular Bethanecol Study Group. *Ann Neurol.* 1992 Nov;32(5):625–32.
66. Rinne J, Kaasinen V, Jarvenpää T, Nagren K, Roivainen A, Yu M, et al. Brain acetylcholinesterase activity in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003 Jan;74(1):113–5.

67. Bordet R. Maladie d'Alzheimer : au-delà de la seule hypothèse cholinergique - Autres systèmes de neurotransmission et modulation des récepteurs nicotiniques. 2003;17:9.
68. Court J, Martin-Ruiz C, Piggott M, Spurden D, Griffiths M, Perry E. Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2001 Feb 1;49(3):175–84.
69. Nordberg A. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol Psychiatry*. 2001 Feb 1;49(3):200–10.
70. Cacabelos R, Takeda M, Winblad B. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 1999 Jan;14(1):3–47.
71. Francis PT. Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2003 Sep;18(Suppl 1):S15-21.
72. Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, Myseros J, Choi SC, Ward JD, et al. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg*. 1998 Oct;89(4):507–18.
73. Schumacher M, Camp S, Maulet Y, Newton M, MacPhee-Quigley K, Taylor SS, et al. Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*. 1986 Feb 30;319(6052):407–9.
74. Mesulam M, Guillozet A, Shaw P, Quinn B. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiol Dis*. 2002 Feb;9(1):88–93.
75. Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jan 25;(1):CD005593.
76. Giacobini E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 2003 Apr;28(3–4):515–22.
77. Lane RM, Potkin SG, Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2006 Feb;9(1):101–24.
78. Darreh-Shori T, Almkvist O, Guan ZZ, Garlind A, Strandberg B, Svensson A-L, et al. Sustained cholinesterase inhibition in AD patients receiving rivastigmine for 12 months. *Neurology*. 2002 Aug 27;59(4):563–72.
79. Tacrine : Un médicament dépassé à rejeter. *Rev. Prescrire* 1998, 18, 736–738.
80. Masuda Y. Cardiac effect of cholinesterase inhibitors used in Alzheimer's disease--from basic research to bedside. *Curr Alzheimer Res*. 2004 Nov;1(4):315–21.
81. Gallarda Th, Lôo H. Mémantine (Ebixa®) : une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement des formes modérément sévères à sévères de la maladie d'Alzheimer. *L'Encéphale*. 2004 Feb 1;30(1):69–79.

82. Tan C-C, Yu J-T, Wang H-F, Tan M-S, Meng X-F, Wang C, et al. Efficacy and Safety of Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, and Memantine for the Treatment of Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis.* 2014 Jan 1;41(2):615–31.
83. Knez D, Coquelle N, Pišlar A, Žakelj S, Jukič M, Sova M, et al. Multi-target-directed ligands for treating Alzheimer's disease: Butyrylcholinesterase inhibitors displaying antioxidant and neuroprotective activities. *Eur J Med Chem.* 2018 Aug 5;156:598–617.
84. Reis J, Cagide F, Valencia ME, Teixeira J, Bagetta D, Pérez C, et al. Multi-target-directed ligands for Alzheimer's disease: Discovery of chromone-based monoamine oxidase/cholinesterase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2018 Oct 5;158:781–800.
85. Liu H, Wang L, Su W, Xie X-Q. Advances in recent patent and clinical trial drug development for Alzheimer's disease. *Pharm Pat Anal.* 2014 Jul;3(4):429–47.
86. Giacobini E, Zhu X D, Williams E, Sherman KA. The effect of the selective reversible acetylcholinesterase inhibitor E2020 on extracellular acetylcholine and biogenic amine levels in rat cortex. *Neuropharmacology.* 1996 Feb;35(2):205–11.
87. Wang Z-M, Cai P, Liu Q-H, Xu D-Q, Yang X-L, Wu J-J, et al. Rational modification of donepezil as multifunctional acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2016 Nov 10;123:282–97.
88. Acetylcholine receptors: muscarinic and nicotinic | CME at Pharmacology Corner <http://pharmacologycorner.com/acetylcholine-receptors-muscarinic-and-nicotinic/>
89. Vieira DB, Gamarra LF. Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood–brain barrier. *Int J Nanomedicine.* 2016 Oct 18;11:5381–414.
90. Cribier B. Particularités anatomiques et histologiques du nez. <https://www.em-consulte.com/en/article/734261>
91. Klossek JM. La physiologie naso-sinusienne. *Rev Fr Allergol Immunol Clin.* 1998 Jan 1;38(7):579–83.
92. Blausen.com staff, staff B com. Medical gallery of Blausen Medical 2014. *WikiJournal Med.* 2014;1(2):10.
93. Frey II WH, Liu J, Chen X, et al. Intranasal delivery of 125 I-NGF to the brain via the olfactory route. In: Iqbal K, Mortimer JA, Winblad B, Wisniewski HM, eds. *Research advances in Alzheimer's disease and related disorders.* John Wiley: New York; 1995:329–335.
94. Kozlovskaya L, Abou-Kaoud M, Stepensky D. Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route. *J Controlled Release.* 2014 Sep 10;189:133–40.
95. Samaridou E, Alonso MJ. Nose-to-brain peptide delivery – The potential of nanotechnology. *Bioorg Med Chem.* 2018 Jun;26(10):2888–905.

96. Proctor DF, Andersen I, Lundqvist GR. Human nasal mucosal function at controlled temperatures. *Respir Physiol*. 1977 Jun 1;30(1):109–24.
97. Wu H, Hu K, Jiang X. From nose to brain: understanding transport capacity and transport rate of drugs. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008 Oct;5(10):1159–68.
98. Cuschieri A. Enzyme histochemistry of the olfactory mucosa and vomeronasal organ in the mouse. *J Anat*. 1974 Dec;118(Pt 3):477–89.
99. Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2001 Oct 1;6:D1192-1206.
100. Yang X, Nauwynck H. Interactions of pseudorabies virus and swine influenza virus with porcine respiratory mucus. 2015.
101. Proctor DF, Andersen I, Lundqvist G. Clearance of Inhaled Particles From the Human Nose. *Arch Intern Med*. 1973 Jan 1;131(1):132–9.
102. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997 Jan 15;23(1):3–25.
103. Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*. 2002 Jun 6;45(12):2615–23.
104. Pharmacopée Européenne, édition 9.5, 01/2008:0676 préparations nasales, pp. 940-942.
105. Formes pharmaceutiques transmucosales - 1.4 - Les formes de la voie nasale. In: 9e Édition de la Pharmacopée Européenne.
106. Physiologie et physiopathologie de l'épuration du mucus des voies aériennes - Encyclopédie médicale Medix
<http://www.medix.free.fr/cours/epuration-mucus.php>
107. Inthavong K, Tian ZF, Tu JY, Yang W, Xue C. Optimising nasal spray parameters for efficient drug delivery using computational fluid dynamics. *Comput Biol Med*. 2008 Jun;38(6):713–26.
108. Inthavong K, Ge Q, Se CMK, Yang W, Tu JY. Simulation of sprayed particle deposition in a human nasal cavity including a nasal spray device. *J Aerosol Sci*. 2011 Feb;42(2):100–13.
109. Edsman K, Carlfors J, Petersson R. Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use. *Eur J Pharm Sci*. 1998;6(2):105–112.
110. Salatin S, Barar J, Barzegar-Jalali M, Adibkia K, Milani MA, Jelvehgari M. Hydrogel nanoparticles and nanocomposites for nasal drug/vaccine delivery. *Arch Pharm Res*. 2016 Sep 1;39(9):1181–92.

111. Renukuntla J, Vadlapudi AD, Patel A, Boddu SHS, Mitra AK. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *Int J Pharm.* 2013 Apr 15;447(1–2):75–93.
112. Witcherle O, Hydrophilic Gels for Biological Use. Vol. 185. 1960. 117 p.
113. Kopeček J, Yang J. Review - Hydrogels as smart biomaterials. Vol. 56. 2007. 1078 p.
114. Van Vlierberghe S, Dubruel P, Schacht E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules.* 2011 May 9;12(5):1387–408.
115. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002 Jan 17;54(1):3–12.
116. Dahl N, Mygind N. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998 Jan 5;29(1–2):3–12.
117. Patel A, Mequanint K. Hydrogel Biomaterials. *Biomed Eng - Front Chall* <https://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-and-challenges/hydrogel-biomaterials>
118. Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer.* 2008 Apr 15;49(8):1993–2007.
119. T. H. Shubhra Q, Toth J, Gyenis J, Feczko T. Poloxamers for Surface Modification of Hydrophobic Drug Carriers and Their Effects on Drug Delivery. Vol. 54. 2014. 112 p.
120. Hitesh R, Rakesh P. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. *Int J PharmTech Res.* April-June 2009(Vol.1, No.2):pp 299-303.
121. Singh-Joy SD, McLain VC. Safety assessment of poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, poloxamer 105 benzoate, and poloxamer 182 dibenzoate as used in cosmetics. *Int J Toxicol.* 2008;27 Suppl 2:93–128.
122. Lucia A, Toloza AC, Guzmán E, Ortega F, Rubio RG. Novel polymeric micelles for insect pest control: encapsulation of essential oil monoterpenes inside a triblock copolymer shell for head lice control. *PeerJ.* 2017;5:e3171.
123. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharm Res.* 2006 Nov 29;23(12):2709–28.
124. Mansuri S, Kesharwani P, Jain K, Tekade RK, Jain NK. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *React Funct Polym.* 2016 Mar;100:151–72.
125. Andrews GP, Donnelly L, Jones DS, Curran RM, Morrow RJ, Woolfson AD, et al. Characterization of the rheological, mucoadhesive, and drug release

- properties of highly structured gel platforms for intravaginal drug delivery. *Biomacromolecules*. 2009 Sep 14;10(9):2427–35.
126. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Nov 3;57(11):1556–68.
 127. Asane GS, Nirmal SA, Rasal KB, Naik AA, Mahadik MS, Rao YM. Polymers for mucoadhesive drug delivery system: a current status. *Drug Dev Ind Pharm*. 2008 Nov;34(11):1246–66.
 128. Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy VV. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*. 2008 Jul;9(7):1837–42.
 129. Rossi S, Ferrari F, Bonferoni MC, Caramella C. Characterization of chitosan hydrochloride-mucin interaction by means of viscosimetric and turbidimetric measurements. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2000;10(4):251–7.
 130. Mahdi MH, Conway BR, Smith AM. Development of mucoadhesive sprayable gellan gum fluid gels. *Int J Pharm*. 2015 Jul 5;488(1–2):12–9.
 131. Bacon A, Makin J, Sizer PJ, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, Illum L, et al. Carbohydrate Biopolymers Enhance Antibody Responses to Mucosally Delivered Vaccine Antigens. *Infect Immun*. 2000 Oct;68(10):5764–70.
 132. Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem Rev*. 2015 Oct 14;115(19):10938–66.
 133. Riaz MK, Riaz MA, Zhang X, Lin C, Wong KH, Chen X, et al. Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 9;19(1).
 134. Rassu G, Soddu E, Cossu M, Brundu A, Cerri G, Marchetti N, et al. Solid microparticles based on chitosan or methyl- β -cyclodextrin: a first formulative approach to increase the nose-to-brain transport of deferoxamine mesylate. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2015 Mar 10;201:68–77.
 135. Muntimadugu E, Dhommatti R, Jain A, Challa VGS, Shaheen M, Khan W. Intranasal delivery of nanoparticle encapsulated tarenflurbil: A potential brain targeting strategy for Alzheimer's disease. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2016 Sep 20;92:224–34.
 136. Zheng X, Shao X, Zhang C, Tan Y, Liu Q, Wan X, et al. Intranasal H102 Peptide-Loaded Liposomes for Brain Delivery to Treat Alzheimer's Disease. *Pharm Res*. 2015 Dec;32(12):3837–49.
 137. Narayan R, Singh M, Ranjan O, Nayak Y, Garg S, Shavi GV, et al. Development of risperidone liposomes for brain targeting through intranasal route. *Life Sci*. 2016 Oct;163:38–45.
 138. Alsarra IA, Hamed AY, Alanazi FK. Acyclovir Liposomes for Intranasal Systemic Delivery: Development and Pharmacokinetics Evaluation. *Drug Deliv*. 2008 Jan 1;15(5):313–21.

139. Law SL, Huang KJ, Chou HY. Preparation of desmopressin-containing liposomes for intranasal delivery. *J Controlled Release*. 2001;70(3):375–382.
140. Jain AK, Chalasani KB, Khar RK, Ahmed FJ, Diwan PV. Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery. *J Drug Target*. 2007 Jan 1;15(6):417–27.
141. Pinzón-Daza ML, Campia I, Kopecka J, Garzón R, Ghigo D, Riganti C. Nanoparticle- and liposome-carried drugs: new strategies for active targeting and drug delivery across blood-brain barrier. *Curr Drug Metab*. 2013 Jul;14(6):625–40.
142. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*. 1965 Aug;13(1):238–52.
143. Motta I. PhD Thesis. 2015.
144. De Kruijff B, Cullis PR, Radda GK. Outside-inside distributions and sizes of mixed phosphatidylcholine-cholesterol vesicles. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 1976 Jul 15;436(4):729–40.
145. Semple SC, Chonn A, Cullis PR. Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. *Biochemistry*. 1996 Feb 27;35(8):2521–5.
146. El-Samaligy MS, Afifi NN, Mahmoud EA. Increasing bioavailability of silymarin using a buccal liposomal delivery system: preparation and experimental design investigation. *Int J Pharm*. 2006 Feb 3;308(1–2):140–8.
147. Rongen HAH, Bult A, van Bennekom WP. Liposomes and immunoassays. *J Immunol Methods*. 1997 May 26;204(2):105–33.
148. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int J Pharm*. 1997 Aug 26;154(2):123–40.
149. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*. 2016 Oct 6;8(4):409–27.
150. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Feb;4(2):145–60.
151. Franz TJ. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol*. 1975 Mar;64(3):190–5.
152. Lindemann J, Leiacker R, Rettinger G, Keck T. Nasal mucosal temperature during respiration. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2002 Jun;27(3):135–9.
153. Lionel Dombu Youta C. Utilisation de nanoparticules pour délivrer des protéines dans les épithéliums respiratoires : caractérisation des mécanismes impliqués. *Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille*; 2012.
154. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961 Jul 1;7(2):88–95.

155. Bolognesi ML, Andrisano V, Bartolini M, Banzi R, Melchiorre C. Propidium-based polyamine ligands as potent inhibitors of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced amyloid-beta aggregation. *J Med Chem*. 2005 Jan 13;48(1):24–7.
156. Soga O, van Nostrum CF, Fens M, Rijcken CJF, Schiffelers RM, Storm G, et al. Thermosensitive and biodegradable polymeric micelles for paclitaxel delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2005 Mar 21;103(2):341–53.
157. Raghavan SR, Cipriano BH. Gel formation: phase diagrams using tabletop rheology and calorimetry. In: *Molecular Gels*, Springer; 2006 p. 241–252. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-3689-2_9
158. Bastiat G, Pritz CO, Roider C, Fouchet F, Lignières E, Jesacher A, et al. A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: A real challenge for fluorescence imaging. *J Controlled Release*. 2013 Sep;170(3):334–42.
159. Martinac A, Filipović-Grcić J, Voinovich D, Perissutti B, Franceschinis E. Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *Int J Pharm*. 2005 Mar 3;291(1–2):69–77.
160. Pereira GG, Dimer FA, Guterres SS, Kechinski CP, Granada JE, Cardozo NSM. Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. *Quím Nova*. 2013;36(8):1121–1125.
161. Wu J, Tian Y, Wang S, Pistolozzi M, Jin Y, Zhou T, et al. Design, synthesis and biological evaluation of bambuterol analogues as novel inhibitors of butyrylcholinesterase. *Eur J Med Chem*. 2017 Jan;126:61–71.
162. Buccafusco JJ. *Cognitive Enhancing Drugs*. Birkhäuser; 2012. 213 p.
163. Dighe SN, Deora GS, De la Mora E, Nachon F, Chan S, Parat M-O, et al. Discovery and Structure-Activity Relationships of a Highly Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor by Structure-Based Virtual Screening. *J Med Chem*. 2016 25;59(16):7683–9.
164. Augustinsson K-B, Bartfai T, Mannervik B. A steady-state kinetic model of butyrylcholinesterase from horse plasma. *Biochem J*. 1974 Sep;141(3):825–34.
165. Sun H, Nguyen K, Kerns E, Yan Z, Yu KR, Shah P, et al. Highly Predictive and Interpretable Models for PAMPA Permeability. *Bioorg Med Chem*. 2017 Feb 1;25(3):1266–76.
166. Terasaki T, Ohtsuki S, Hori S, Takanaga H, Nakashima E, Hosoya K. New approaches to in vitro models of blood-brain barrier drug transport. *Drug Discov Today*. 2003 Oct 15;8(20):944–54.
167. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*. 1995 Mar;12(3):413–20.

168. German Diabetes Center. The effect of central insulin on insulin sensitivity and energy metabolism (Centrin). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01479075. <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01479075>> Published 2011.
169. Freiherr J, Hallschmid M, Frey WH, Br  nner YF, Chapman CD, H  lscher C, et al. Intranasal Insulin as a Treatment for Alzheimer’s Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence. *CNS Drugs*. 2013 Jul;27(7):505–14.
170. Gozes I, Morimoto BH, Tiong J, Fox A, Sutherland K, Dangoor D, et al. NAP: research and development of a peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP). *CNS Drug Rev*. 2005;11(4):353–68.
171. Ozsoy Y, G  ng  r S. Nasal route: an alternative approach for antiemetic drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2011 Nov;8(11):1439–53.
172. Schlegel PN, Histrelin Study Group. Efficacy and safety of histrelin subdermal implant in patients with advanced prostate cancer. *J Urol*. 2006 Apr;175(4):1353–8.
173. Momoh FU, Boateng JS, Richardson SCW, Chowdhry BZ, Mitchell JC. Development and functional characterization of alginate dressing as potential protein delivery system for wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2015 Nov;81:137–50.
174. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med*. 2008 Apr;2(2–3):81–96.
175. Thorn RMS, Greenman J, Austin A. An in vitro study of antimicrobial activity and efficacy of iodine-generating hydrogel dressings. *J Wound Care*. 2006 Jul;15(7):305–10.
176. Su J, Hu B-H, Lowe WL, Kaufman DB, Messersmith PB. Anti-Inflammatory Peptide Functionalized Hydrogels for Insulin-Secreting Cell Encapsulation. *Biomaterials*. 2010 Jan;31(2):308–14.
177. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Absorption of insulin from pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. *Int J Pharm*. 1999 Jul 20;184(2):189–98.
178. Liu Y, Zhu Y, Wei G, Lu W. Effect of carrageenan on poloxamer-based in situ gel for vaginal use: Improved in vitro and in vivo sustained-release properties. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2009 Jun 28;37(3–4):306–12.
179. Mura P, Mennini N, Nativi C, Richichi B. In situ mucoadhesive-thermosensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of opiorphin. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2018 Jan;122:54–61.
180. Choi H-G, Jung J-H, Ryu J-M, Yoon S-J, Oh Y-K, Kim C-K. Development of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository. *Int J Pharm*. 1998 Apr 20;165(1):33–44.

181. Kapoor M, Cloyd JC, Siegel RA. A review of intranasal formulations for the treatment of seizure emergencies. *J Controlled Release*. 2016 Sep 10;237:147–59.
182. Feng Y, He H, Li F, Lu Y, Qi J, Wu W. An update on the role of nanovehicles in nose-to-brain drug delivery. *Drug Discov Today*. 2018;23(5):1079–88.
183. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J Colloid Sci Biotechnol*. 2012 Dec 1;1(2):147–68.
184. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015 Feb 2;10:975–99.
185. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*. 2017 Mar 27;9(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5489929/>
186. Sahebkar A, Badiie A, Ghayour-Mobarhan M, Goldouzian SR, Jaafari MR. A simple and effective approach for the treatment of dyslipidemia using anionic nanoliposomes. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Oct 1;122:645–52.
187. Di Sotto A, Paolicelli P, Nardoni M, Abete L, Garzoli S, Di Giacomo S, et al. SPC Liposomes as Possible Delivery Systems for Improving Bioavailability of the Natural Sesquiterpene β -Caryophyllene: Lamellarity and Drug-Loading as Key Features for a Rational Drug Delivery Design. *Pharmaceutics*. 2018 Dec 13;10(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6321237/>
188. Ahmad E, Feng Y, Qi J, Fan W, Ma Y, He H, et al. Evidence of nose-to-brain delivery of nanoemulsions: cargoes but not vehicles. *Nanoscale*. 2017 Jan 19;9(3):1174–83.
189. Mistry A, Stolnik S, Illum L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int J Pharm*. 2009 Sep 8;379(1):146–57.
190. Morrison EE, Costanzo RM. Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microsc Res Tech*. 1992 Oct 1;23(1):49–61.
191. Wen MM. Olfactory targeting through intranasal delivery of biopharmaceutical drugs to the brain: current development. *Discov Med*. 2011 Jun;11(61):497–503.
192. Hanafy AS, Farid RM, ElGamal SS. Complexation as an approach to entrap cationic drugs into cationic nanoparticles administered intranasally for Alzheimer's disease management: preparation and detection in rat brain. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015;41(12):2055–68.
193. Lai SK, Suk JS, Pace A, Wang Y-Y, Yang M, Mert O, et al. Drug carrier nanoparticles that penetrate human chronic rhinosinusitis mucus. *Biomaterials*. 2011 Sep;32(26):6285–90.
194. Van Woensel M, Wauthoz N, Rosière R, Amighi K, Mathieu V, Lefranc F, et al. Formulations for Intranasal Delivery of Pharmacological Agents to Combat Brain

- Disease: A New Opportunity to Tackle GBM? *Cancers*. 2013 Aug 14;5(3):1020–48.
195. Taylor KMG, Taylor G, Kellaway IW, Stevens J. Drug entrapment and release from multilamellar and reverse-phase evaporation liposomes. *Int J Pharm*. 1990 Jan 15;58(1):49–55.
 196. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci*. 2015 Apr;10(2):81–98.
 197. Xu X, Khan MA, Burgess DJ. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: II. Screening of critical variables, and establishment of design space at laboratory scale. *Int J Pharm*. 2012 Feb;423(2):543–53.
 198. Xu X, Khan MA, Burgess DJ. Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. *Int J Pharm*. 2012 Feb;423(2):410–8.
 199. Ruel-Gariepy E, Leclair G, Hildgen P, Gupta A, Leroux J-C. Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules. *J Controlled Release*. 2002;82(2):373–383.
 200. Mourtas S, Fotopoulou S, Duraj S, Sfika V, Tsakiroglou C, Antimisiaris SG. Liposomal drugs dispersed in hydrogels. Effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007 Apr 1;55(2):212–21.
 201. Ruigrok MJR, De Lange ECM. Emerging Insights for Translational Pharmacokinetic and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Studies: Towards Prediction of Nose-to-Brain Transport in Humans. *AAPS J*. 2015 May;17(3):493–505.
 202. Briuglia M-L, Rotella C, McFarlane A, Lamprou DA. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Deliv Transl Res*. 2015 Jun 1;5(3):231–42.
 203. Thorne RG, Frey WH. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(12):907–46.
 204. Thorne RG, Emory CR, Ala TA, Frey WH. Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res*. 1995 Sep 18;692(1–2):278–82.
 205. Karavasili C, Fatouros DG. Smart materials: in situ gel-forming systems for nasal delivery. *Drug Discov Today*. 2016 Jan;21(1):157–66.
 206. Ds J, An B, Rb A, Ss S, A P, Pn G, et al. Thermosensitive PLA based nanodispersion for targeting brain tumor via intranasal route. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Jun;63:411–21.

207. Vaka SRK, Sammeta SM, Day LB, Murthy SN. Delivery of nerve growth factor to brain via intranasal administration and enhancement of brain uptake. *J Pharm Sci.* 2009 Oct;98(10):3640–6.
208. Vaka SRK, Murthy SN, Balaji A, Repka MA. Delivery of brain-derived neurotrophic factor via nose-to-brain pathway. *Pharm Res.* 2012 Feb;29(2):441–7.
209. FDA. Nonclinical Safety Evaluation of Reformulated Drug Products and Products Intended for Administration by an Alternate Route – Guidance for Industry and Review Staff Good Review Practice. Pharmacology/Toxicology. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm079245.pdf> Published 2015.

IX. Annexe

*Tableau 13 : Composition et caractérisation physique des liposomes (*ratio molaire de SPC ou EPC / cholestérol ;
²Valeurs moyennes $\pm$ écart type, n=3 ; Conditions réhydratation : A : Vortex 2 min, 20 °C ; B : 30 min, 80 tpm, 20 °C ; C : 1h, 80 tpm 40 °C ; D : 30 min ; E : 30 minutes d'agitation magnétique (80 tpm) à 40 °C combinées à 1 minute de vortex .

Lot	Ratio lipides*	C _{lipides} (mM)	Ratio Lipide/PA*	Cond. réhyd.	Diamètre (nm) ^{*2}	PDI ^{*2}	Potentiel ζ (mv) ^{*2}
Lipo-1	SPC 8:1	34	0	A	116,9 $\pm$ 0,5	0,06 $\pm$ 0,01	- 5,0 $\pm$ 0,5
Lipo-2	SPC 8:1	34	3:2	A	120,0 $\pm$ 0,1	0,05 $\pm$ 0,01	+ 2,3 $\pm$ 0,2
Lipo-3	SPC 8:1	34	3:2	B	112,6 $\pm$ 0,0	0,04 $\pm$ 0,02	- 1,1 $\pm$ 0,1
Lipo-4	SPC 8:1	34	3:2	C	105,3 $\pm$ 0,3	0,04 $\pm$ 0,01	+ 2,9 $\pm$ 0,3
Lipo-5	SPC 1:1	60	5:2	D	131,3 $\pm$ 0,2	0,04 $\pm$ 0,01	- 1,1 $\pm$ 0,1
Lipo-6	SPC 1:1	120	5:1	D	129,4 $\pm$ 0,2	0,06 $\pm$ 0,02	- 1,1 $\pm$ 0,1
Lipo-7	SPC 8:1	120	10:1	E	111,4 $\pm$ 0,5	0,06 $\pm$ 0,02	- 0,3 $\pm$ 0,1
Lipo-8	SPC 8:1	120	5:1	E	114,5 $\pm$ 0,2	0,04 $\pm$ 0,01	+ 1,0 $\pm$ 0,4
Lipo-9	EPC 8:1	120	5:1	E	116,6 $\pm$ 0,2	0,06 $\pm$ 0,04	- 0,3 $\pm$ 0,2
Lipo-10	EPC 8:1	120	10:1	E	121,5 $\pm$ 0,3	0,05 $\pm$ 0,02	+ 1,0 $\pm$ 0,4
Lipo-11	SPC 1:1	120	40:1	E	133,3 $\pm$ 1,6	0,04 $\pm$ 0,01	- 1,1 $\pm$ 0,6

Tableau 14 : Variation des propriétés granulométriques et de surface après mise en œuvre de la séparation sur colonne et détermination du taux d'encapsulation de différentes formulations de liposomes.

Formulation	Δ diamètre (nm)	Δ PDI	EE (%) Sephadex™
Lipo-3	-1,1	0	1,9
Lipo-4	2,6	0,03	1,0
Lipo-5	1,2	0,01	5,9
Lipo-6	2,7	0,01	7,5
Lipo-7	-0,6	0,01	10,1
Lipo-8	3,2	0,02	11,6
Lipo-9	0,1	-0,01	13,2
Lipo-10	-1,1	0	16,3
Lipo-11	-3,2	0	17,6



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE DES
SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

TITRE

ADMINISTRATION PAR VOIE INTRANASALE D'UN PRINCIPE ACTIF HYDROPHILE D'INTERET THERAPEUTIQUE POTENTIEL POUR LE TRAITEMENT DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Résumé

Cette étude visait à préparer et caractériser des formulations de gels thermosensibles à base de poloxamères (p407 et p188) en vue d'une délivrance prolongée, par le biais de liposomes, d'un principe actif (PA) pharmaceutique présentant un intérêt potentiel pour la maladie d'Alzheimer par voie nasale. Le PA a été caractérisé comme étant un inhibiteur sélectif de la butyrylcholinestérase, mais présente une faible perméabilité à travers le modèle de barrière hémato-encéphalique. L'osmolarité et la température de gélification ($T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$) des formulations, définies dans un diagramme ternaire, ont été étudiées par analyse rhéologique et détermination visuelle. Des liposomes chargés en PA ont été préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique. Leurs propriétés ont été évaluées en termes de granulométrie, de potentiel zêta et de taux d'encapsulation. A l'issue de ces essais, un mélange composé de P407/188 15/1 (% , masse/masse) a été choisi, compatible avec l'administration intranasale et la muqueuse olfactive en termes de $T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$ ($34,5^{\circ}\text{C} \pm 0,3$), d'osmolarité (280 ± 20 mosmol) et de pH (6). Des études de mucoadhésion ont établi que ce gel présentait de bonnes caractéristiques mucoadhésives naturelles, et augmentées en présence de liposomes. Les cinétiques de libération ont montré que la formulation composite permettait une libération prolongée et complète du PA. Ce travail de thèse a permis le développement d'une formulation innovante, administrable par voie intranasale, assurant un temps de résidence prolongé dans la cavité nasale et libérant de façon maîtrisée un PA d'intérêt thérapeutique pour le traitement d'une maladie neurodégénérative incurable à ce jour.

TITLE

INTRANASAL ADMINISTRATION OF A HYDROPHILIC ACTIVE INGREDIENT OF POTENTIAL THERAPEUTIC INTEREST FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

Summary

This study aimed at preparing and characterizing thermosensitive gel formulations based on a mixture of two hydrophilic polymers (Poloxamer 407 and 188) for a sustained delivery via liposomes of an active pharmaceutical ingredient (API) of potential interest for Alzheimer's disease through nasal route. API was characterized as being a selective inhibitor of butyrylcholinesterase but presents a low permeability through brain blood barrier model. The osmolarity and the gelation temperature ($T^{\circ}_{\text{sol-gel}}$) of formulations, defined in a ternary diagram, were investigated by rheometry and visual determination. At the issue of assays, a mixture composed of p407/p188 (15/1 %, w/w) was selected, being compatible with intranasal administration in terms of ($T^{\circ}_{\text{sol-gel}} = 34,5^{\circ}\text{C} \pm 0,3$) and with the olfactory mucosal (280 ± 20 mOsmol, pH 6). Liposomes of API were prepared by the thin film hydration method. various parameters such as lipid ratio, concentration and lipid to drug ratio were investigated to obtain acceptable entrapment efficiency (EE). Formulations were evaluated for vesicle size granulometry, zeta potential, and EE determined after purification. Mucoadhesion studies were performed, and showed that in situ gel formulations present good natural mucoadhesive characteristics, that could be increased with liposomes. Drug release studies showed the API was successfully and completely released with a controlled rate, and slower than with API-loaded solutions or gels. The study demonstrated successful formulation of a promising API-loaded liposomes in a thermosensitive hydrogel for nasal delivery.

Mots-clés

Maladie d'Alzheimer, hydrogels thermosensibles, liposomes