



HAL
open science

Conception, synthèse et formulation de nucléolipides originaux pour le ciblage de neurones d'intérêt dans le cadre de la maladie de Parkinson.

Anthony Cunha

► **To cite this version:**

Anthony Cunha. Conception, synthèse et formulation de nucléolipides originaux pour le ciblage de neurones d'intérêt dans le cadre de la maladie de Parkinson.. Chimie organique. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0280 . tel-03524993

HAL Id: tel-03524993

<https://theses.hal.science/tel-03524993>

Submitted on 13 Jan 2022

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ : CHIMIE ORGANIQUE

Par Anthony CUNHA

**Conception, synthèse et formulation de nucléolipides originaux
pour le ciblage de neurones d'intérêt dans le cadre de la maladie
de Parkinson**

Sous la direction de : Dr. Laurent LATXAGUE et Dr. Benjamin DEHAY

Soutenue le 3 Décembre 2021

Membres du jury :

Dr. BARTHELEMY, Philippe	Pr, Université de Bordeaux	Président
Dr. ESCLATINE, Audrey	Pr, Université Paris-Saclay	Rapporteur
Dr. PEYROTTE, Suzanne	DR, CNRS, Montpellier	Rapporteur
Dr. LIENARD, Philippe	Dr, SANOFI-AVENTIS, Vitry-Sur-Seine	Examineur
Dr. GAUBERT, Alexandra	MCF, Université de Bordeaux	Membre invité
Dr. LATXAGUE, Laurent	MCF, Université de Bordeaux	Directeur de thèse
Dr. DEHAY, Benjamin	CRCN, INSERM, Bordeaux	Directeur de thèse



Dirigée par le Professeur Philippe Barthélémy

Unité de recherche

Laboratoire ARNA ARN : Régulation Naturelle et Artificielle – équipe ChemBioPharm,
INSERM U1212, CNRS UMR 5320, Université de Bordeaux, Bâtiment Pharmacie,
3^{ème} tranche, 4^{ème} étage, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

Ce travail de thèse résulte d'un appel à projet émis par le collège des écoles doctorales de l'université de Bordeaux pour l'attribution d'un contrat doctoral interdisciplinaire. Associant deux champs disciplinaires (chimie et neurosciences) et deux écoles doctorales distinctes (l'ED des sciences chimiques et l'ED des sciences de la vie et de la santé) ce travail s'est déroulé sous la co-direction du Docteur Laurent Latxague (ARNA) et du Docteur Benjamin Dehay (IMN).



Dirigée par le Directeur de Recherche Thomas Boraud

Unité de recherche

Laboratoire IMN : Institut des Maladies Neurodégénératives – équipe Physiopathologie des syndromes parkinsoniens, CNRS UMR 5293 - CNRS/Université de Bordeaux - Centre Broca Nouvelle-Aquitaine – 3^{ème} étage - 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

Je dédie cette thèse à la mémoire du Dr. Laurent Latxague

Un mentor ...

... devenu un ami

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord exprimer toute ma gratitude au **Professeur Audrey Esclatine** et au **Directeur de recherche Suzanne Peyrottes** pour l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse ainsi que le **Professeur Philippe Barthélémy** le **Docteur Philippe Liénard** pour faire partie du jury en tant qu'examineur. Je remercie également mon comité de thèse, le **Professeur Stéphane Grelier** et le **Docteur Frédéric Friscourt**, pour leurs conseils et leur disponibilité tout au long de cette thèse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, qui m'a permis de réaliser cette thèse.

Ce travail interdisciplinaire est le fruit d'une collaboration entre deux laboratoires de recherche, l'équipe ChemBioPharm dirigée par le **Professeur Philippe Barthélémy** et l'équipe Physiopathologie des syndromes parkinsoniens dirigée par le **Directeur de recherche Erwan Bézard** au sein de l'Institut des Maladies Neurodégénératives. Je vous remercie de m'avoir hébergé et accompagné dans vos laboratoires respectifs pendant ces trois années ainsi que de la confiance que vous m'avez accordée.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant cette aventure et notamment mes directeurs de thèse pour leur soutien, leur grande disponibilité et leurs nombreux conseils.

Docteur Benjamin Dehay, je vous remercie non seulement pour la patience dont vous avez fait preuve, mais également pour m'avoir initié aux Neurosciences et prodigué de nombreux conseils pour débiter dans ce domaine qui m'était encore inconnu. J'ai beaucoup appris à vos côtés et je resterai à jamais reconnaissant de toute l'aide et le soutien que vous m'avez apporté.

J'ai une pensée toute particulière pour le **Docteur Laurent Latxague** que j'ai eu la chance de côtoyer pendant 4 ans en tant que co-directeur de stage puis de thèse. Je n'oublierai pas la confiance qu'il m'a accordée, ses qualités pédagogiques et scientifiques ainsi que sa sympathie. Son soutien sans faille et son aide ont fait de moi la personne et le scientifique que je suis aujourd'hui. Pour l'anecdote, je garderai en mémoire notre *escape game* à 1h du matin dans la forêt ou encore nos éclats de rire qui résonneront encore longtemps dans le laboratoire.

J'ai eu la chance de travailler dans deux équipes chaleureuses et accueillantes au sein desquelles j'ai fait de belles rencontres. Il reste très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

À l'équipe ChemBioPharm :

Atteindre mes objectifs n'aurait jamais été possible sans l'aide du Docteur **Alexandra Gaubert**. Je ne saurais jamais être assez reconnaissant pour tout le soutien que tu m'as apporté que ce soit du côté encadrement de la partie physico-chimie, ou du côté personnel. Mis à part tes excellentes qualités scientifiques en tant que chercheur, tu es une personne généreuse avec un grand cœur et sur qui j'ai toujours pu compter. Les moments de craquage autour d'un muffin du Relais H et nos retrouvailles autour d'une planche au petit Québec me manqueront. Tu n'as pas intérêt à m'oublier parce que moi je ne le ferai pas !

Julie ou Juju Baillet, dès le premier jour ça a été le coup de foudre entre nous. Je le sais, tu le sais, ils/elles le savent. Quel honneur d'avoir pu partager les premières années de ma thèse avec toi. Dès mon arrivée, tu m'as pris sous ton aile au laboratoire et je dois avouer que je te dois la majorité de mes aptitudes de chimiste. Je me souviens de nos rigolades à peine arrivés le matin à ChemBioPharm (comme des pintades, quel compliment), de notre séance de tir improvisée (petite précision : pistolet pour enfants) et de nos sorties dans les rues de Bordeaux. Plus qu'une collègue, tu es devenue une véritable amie et pour ça je t'en remercie.

Jessica, la troisième mama, une personne aux multiples talents (je me souviendrai surtout de ton talent de pâtissière et de tes délicieux macarons). Je sais que selon toi je suis un fils indigne et je ne sais pas si je te manquerai mais je suis au moins sûr que je manquerai à ton chien. Tu as été ma première coloc de bureau, celle avec qui j'ai passé de longs moments à prendre des photos, qui, qu'on se le dise n'étaient pas très flatteuses. Je te remercie pour les nombreux beaux souvenirs que j'ai avec toi que ce soit nos journées sur le bassin, les *escape games* ou les sorties pour aller voir ton petit poney.

Arthur, prépare-toi Grand Chimiste car tu es le prochain. Ce n'est pas pour rien que je me suis tout de suite entendu avec toi. Je pense que tu es la personne du laboratoire qui me ressemble le plus que ce soit de par notre taille, notre chevelure ou notre humour (de vrais jumeaux). Les fins de journées au petit Québec vont me manquer et il me tarde qu'on se retrouve pour déguster une pizza spécialement préparée par Yannick.

En parlant de **Yannick** (ou Lutin Grognon), je souhaite te remercier pour ton amitié. Tu es une personne sur qui j'ai toujours pu compter peu importe la situation. J'ai adoré venir au laboratoire pour t'écouter me raconter tes rêves bleus, nos soirées cinéma et sushis ou encore passer des soirées jeux de sociétés avec Jérémie et toi. J'espère que tu ne seras pas trop triste de ne plus nous entendre chanter notre fameuse chanson « *Yanni Yanna* » avec Arthur dans le laboratoire.

J'ai également une pensée pour **Jérémie**, une personne d'une profonde gentillesse, et pour **Louise** qui m'a fait découvrir ses fameux gâteaux aux légumes.

Je souhaite également remercier l'une des personnes les plus importantes du laboratoire : l'homme des cartons ... **Julien**. Toujours présent pour nous faire rire (surtout avec tes chansons ringardes), tu es le rayon de soleil de CheumBioPharm. Déjà grand chimiste, tu t'apprêtes également à devenir le meilleur des pères. Je te remercie pour ta joie de vivre et je ne te souhaite que le meilleur pour toi et ta petite famille.

Bérangère, que dire de toi mis à part que tu imites à la perfection le cacatoès femelle. Vu que tu n'étais qu'à 50% au laboratoire je te remercie à 50%. MER... Je n'ai pas pu t'embêter autant que je l'aurais voulu, mais j'ai apprécié nos rigolades. Tu rentres dans ta troisième année donc je te souhaite bonne chance pour la dernière ligne droite. Compte sur moi pour être présent à ta soutenance et surtout au pot.

Paty-patou, ton petit air innocent a été rafraîchissant pendant cette dernière année de thèse et je te souhaite que le meilleur avec Medhi.

Je remercie de plus tous les membres de l'équipe ChemBioPharm qui ont contribué à rendre le travail au quotidien plus agréable et sans qui je n'aurais pas pu évoluer aussi bien au sein du laboratoire. J'ai une pensée toute particulière pour **Natasha Perebaskine** et les Docteurs **Arnaud Gissot**, **Tina Kauss** et **Jeanne LeBlond Chain**.

À l'équipe de l'Institut des Maladies Neurodégénératives :

Bien entendu je ne pouvais que commencer par toi ... **Margaux**, ma collègue de thèse, alias mon grand faucon. On a débuté notre thèse ensemble et je dois dire que je n'aurais pu rêver mieux comme partenaire pour m'accompagner dans cette aventure. Tu es l'une des personnes les plus fortes, gentilles et intelligentes que je connaisse et il n'y a pas un moment où tu n'as pas su me communiquer ta joie de vivre. Tu as toujours été présente pour m'épauler quand j'étais perdu dans le laboratoire, tel un « *petit oisillon* » tombé de son nid comme tu dirais. Même si nos chemins se séparent maintenant j'espère que l'on gardera contact dans nos futures vies et qu'on finira par élever des chèvres ensemble.

Passons au duo de choc, les Marie-Laure.

MLA, bien que tu aies une réputation de grincheuse, je n'ai pas eu la chance d'en être témoin. J'ai adoré te taquiner à longueur de journée, t'écouter râler à propos des stagiaires et des personnes qui ne savent pas manipuler (AH mais attends si maintenant que j'y pense, tu es bien grincheuse). Je me souviendrai toujours de ton « *salut Anthoooo* » qui me mettait de bonne humeur quand je rentrais dans le bureau, ou des nombreuses fois où tu m'as aidé pendant la thèse. PS : à l'heure à laquelle tu liras ces lignes, tu seras probablement en vacances (parce que tu es toujours en vacances) donc je compte sur toi pour me faire rêver avec tes « *story insta* ».

MLT ou madame Thiolat, mon guide au sein du laboratoire. Je te remercie car la tâche qui t'a été confiée, à savoir me former aux Neurosciences, n'a pas été facile ! Chaque nouvelle technique que j'ai appris grâce à toi au cours de ces trois années m'ont permis de mener à bien cette thèse interdisciplinaire. J'ai adoré apprendre à te connaître surtout pendant la pause-déjeuner à 11h30 (attention pas plus tard).

Evelyne, tu es une personne d'une douceur infinie et je te remercie pour avoir partagé mon quotidien au sein du laboratoire.

Je souhaite également remercier mon tyran de tous les jours **Alexia** sans qui mes visites à l'IMN n'auraient pas eu la même saveur.

Enfin, je souhaite remercier la team des morfales avec qui j'ai partagé de nombreux petit-déjeuners le vendredi matin : **Claire**, même si on ne se connaît pas depuis très longtemps j'ai adoré rigoler avec toi et ta bonne humeur. **Morgane**, je serai toujours autant impressionné par ton organisation parfaite et ton bureau digne d'un post *Pinterest*. **Joanna**, not only you're a wonderful chef but you are also a caring person with a great heart, good advice and I have enjoyed every discussion with you.

Mes pensées vont également à mes amis et mes proches qui m'ont toujours motivé et encouragé. Je pense notamment à Anaïs et Cécile, je n'ai pas de mots assez forts pour vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi. Vous êtes de vraies amies toujours présentes pour m'écouter, m'encourager et me soutenir. **Anaïs**, je te remercie pour les bons moments passés ensemble, nos séances McDonald's-Cinéma que je ne compte plus, nos après-midis à l'appartement à jouer à Mario Party et nos petits debriefs sur le chemin que l'on a parcouru depuis notre rencontre en Licence. **Cécile**, je n'oublierai jamais nos fous rires, nos vacances que l'on peut caractériser de rocambolesques et nos sorties à la foire aux plaisirs pour perdre

tout notre argent dans les attrapes peluches. Ces instants magiques seront gravés à jamais dans ma mémoire.

Alexandre, je te remercie de m'avoir aidé à traverser cette dernière année de thèse et d'être resté à mes côtés même lorsque j'étais la plus chiant des personnes.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements aux personnes les plus importantes de ma vie, ma famille : mes parents, ma petite sœur, mes tantes et ma cousine **Kelly**. Un grand merci à ma **maman** sans qui je n'en serai pas là aujourd'hui et à qui je dois tout. Merci pour ton amour et ton soutien inconditionnel, bien plus qu'une mère tu es tout simplement un modèle dans ma vie. **Loïse**, malgré que je sois ton grand frère, les rôles ont toujours été inversés. Tu as toujours été là pour prendre soin de moi, me défendre et me soutenir et je suis très fier de la personne que tu es devenue.

SOMMAIRE

LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES	1
ABRÉVIATIONS	7
INTRODUCTION	13
ÉTAT DE L'ART	17
Chapitre I : La maladie de Parkinson	19
1- Définition et épidémiologie	19
2- Manifestations cliniques	20
3- Étiologie de la maladie de Parkinson	21
4- Traitements	22
4.1- Thérapies fonctionnelles et invasives	22
4.2- Thérapies médicamenteuses	24
5- Physiopathologie	27
5.1- Autophagie : Voie cellulaire de dégradation de protéines et organites	29
5.2- Les différentes formes d'autophagie	29
5.3- Autophagie dans le cas de la maladie de Parkinson	31
Chapitre II : Le tréhalose, une substance active prometteuse	33
1- Mécanisme d'action du Tréhalose	34
2- Le tréhalose pour le traitement des maladies neurodégénératives	36
2.1- Tréhalose contre la maladie d'Huntington	36
2.2- Tréhalose contre la maladie d'Alzheimer	36
2.3- Tréhalose contre la maladie de Parkinson	37
Chapitre III : Transport d'agents thérapeutiques vers le système nerveux central	41
1- La Barrière Hémato-Encéphalique	41
1.1- Structure et fonction	41
1.2- Mécanisme de transport à travers la barrière hémato-encéphalique	43
2- Les nanotechnologies au service du passage de la BHE	47
2.1- Les nanoémulsions	47
2.2- Les nanoparticules	51
3- Délivrance du tréhalose au sein du système nerveux central	56
Chapitre IV : Les nucléolipides, des molécules d'intérêt biologique	58
1- Structure, occurrence et propriétés biologiques des nucléolipides	58
1.1- Les nucléolipides d'origine naturelle	59
1.2- Les Nucléolipides synthétiques	60
2- Propriétés d'auto-assemblage des nucléolipides	62
3- Nucléolipides et passage des membranes biologiques	67
OBJECTIFS DE LA THÈSE	69
RÉSULTATS ET DISCUSSION	73

Chapitre V : Intérêt des NPs de PLGA pour la restauration du pH lysosomal	75
Chapitre VI : Développement de NPs à base de GNLs pour l'administration de substances actives.....	129
1- Développement et synthèse de dérivés glyconucléolipidiques	129
1.1- Synthèse des GNLs en série thymidine	132
1.2- Synthèse du Bis-GNL et de dérivés tréhalose-lipides.....	143
1.3- Synthèse des GNLs en série adénosine.....	145
1.4- Conclusion et perspectives.....	157
2- Formulation et caractérisation physico-chimique des nanovecteurs.....	158
2.1- Test de solubilité des différents composés synthétisés	158
2.2- Développement de nanovecteurs à base de dérivés du tréhalose	160
2.3- Caractérisations physico chimiques des nanovecteur	164
2.4- Efficacité d'encapsulation et taux d'encapsulation	172
2.5- Conclusion et perspectives.....	175
3- Évaluation biologique	176
3.1- Étude de la toxicité des formulations.....	176
3.2- Internalisation des NPs à l'intérieur de neurones.....	177
3.3- Évaluation des propriétés d'induction du flux autophagique des NP chargées en GNLs	178
3.4- Conclusion et perspectives.....	180
CONCLUSION GÉNÉRALE	205
RÉFÉRENCES	211
PARTIE EXPÉRIMENTALE	231
Chapitre VII- Synthèses	233
1- Synthèse de GNL en série thymidine.....	234
2- Synthèse de GNL en série adénosine.....	249
3- Synthèse de dérivés tréhalose	257
Chapitre VIII- Formulation et physico-chimie.....	261
Chapitre IX- Évaluation biologique	265
ANNEXES.....	269
Revue – <i>PLGA-Based Nanoparticles for Drug Delivery in Neurodegenerative Diseases</i> 271	
Article - <i>Synthesis and Intracellular Uptake of Rhodamine–Nucleolipid Conjugates into a Nanoemulsion Vehicle</i>	297

***LISTES DES TABLEAUX ET
FIGURES***

Listes des figures :

Figure 1. Les deux voies de recherches étudiées dans ce projet.	16
Figure 2. La maladie de Parkinson.....	19
Figure 3. Les différents symptômes et étapes de la maladie de Parkinson.	20
Figure 4. La neurostimulation cérébrale profonde.	23
Figure 5. Stratégies thérapeutiques pour l'augmentation de la demi-vie de la Lévodopa.	25
Figure 6. Les corps de Lewy.	27
Figure 7. Représentation schématique d'un neurone.	29
Figure 8. Les trois formes d'autophagie.	30
Figure 9. Le tréhalose une substance active aux diverses origines.	33
Figure 10. Potentiels mécanismes d'action du tréhalose.	35
Figure 11. Structure de la Barrière Hémato-Encéphalique.	41
Figure 12. Mécanismes de transport à travers la barrière hémato-encéphalique.	43
Figure 13. Les deux principaux types de nanoémulsions.....	488
Figure 14. Structures chimiques de substances actives encapsulées à l'intérieur de nanoémulsions.	50
Figure 15. Images de cryo-microscopie électronique à transmission de suspensions de SLNs.	54
Figure 16. Développement de nanoparticules de poly(tréhalose).	56
Figure 17. La grande variété structurale des nucléolipides.	58
Figure 18. Structures chimiques de nucléolipides naturels.	59
Figure 19. Structures chimiques de nucléolipides synthétiques.....	61
Figure 20. Les différents types d'interactions.	62
Figure 21. Structures chimiques de divers nucléolipides.	63
Figure 22. Les propriétés d'auto-assemblage des nucléolipides.	65
Figure 23. Synthèse et internalisation cellulaire de conjugués Rhodamine–nucléolipide encapsulés dans des nanoémulsions.	68
Figure 24. Les NPs de PLGA pour le traitement de la maladie de Parkinson.	76
Figure 25 : Différents types de fonctionnalisations des nucléosides par l'équipe du Pr. Philippe Barthélémy.	129
Figure 26. Création de lien ester <i>via</i> l'utilisation de carbodiimides.....	130
Figure 27. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen thermique.....	131
Figure 28. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre (CuAAC).	132
Figure 29. Schéma rétrosynthétique des GNLs en série thymidine.	133

Figure 30. Schéma général de synthèse conduisant à l'obtention des parties nucléolipidiques.	134
Figure 31. Mécanisme d'obtention de la 5'azidothymidine.....	135
Figure 32. Les premières voies de synthèses étudiées pour l'ajout de l'espaceur.	136
Figure 33. Schéma général de synthèse conduisant à l'obtention du tréhalose-TM ₆	137
Figure 34. Étape de couplage conduisant à l'obtention des GNLs.	13738
Figure 35. Estérification enzymatique.	13839
Figure 36. Étude de la voie de synthèse bleue.	13941
Figure 38. Première voie de synthèse étudiée pour l'obtention d'un GNL-thymidine bicaténaire.	14142
Figure 39. Seconde voie de synthèse étudiée pour l'obtention d'un GNL-thymidine bicaténaire.	14243
Figure 40. Étape de couplage conduisant à l'obtention du GNL thymidine bicaténaire. ..	14243
Figure 41. Développement de nouveaux composés.	14445
Figure 42. Schéma rétrosynthétique des GNLs en série adénosine.	14647
Figure 43. Schéma général de synthèse conduisant à l'obtention des parties nucléolipidiques en série adénosine.....	14748
Figure 44. Mono-protection de l'adénine.....	14849
Figure 45. Les différentes voies de synthèse étudiées pour l'ajout de l'espaceur.....	14849
Figure 46. Les premières voies de synthèse étudiées pour la déprotection.....	14950
Figure 47. Les premières voies de synthèse étudiées pour la déprotection.....	14950
Figure 48. Les premières voies de synthèses étudiées pour la déprotection.	15051
Figure 49. Réaction générique de déprotection des dérivés adénosine.....	15152
Figure 50. Spectre RMN du composé 28.	15354
Figure 51. Tentative de désacétylation.....	15556
Figure 52. Schéma récapitulatif de la synthèse de la partie nucléosidique.	15657
Figure 53. Futures étapes de couplage pour obtenir le nucléolipide et le GNL.	15758
Figure 54. Les deux techniques de formulations utilisées.....	16061
Figure 55. Les différentes formulations obtenues par <i>rapid mixing</i>	16364
Figure 56. Suivi de la stabilité colloïdale des SLNs et NPs de PLGA chargées ou non en GNLs.	16566
Figure 57. Images de TEM des différentes formulations et valeurs moyennes de leurs diamètres.	16768
Figure 58. Étude par cartographie chimique (METB) de F4.	16970

Figure 59. Analyses infrarouges et tableau résumé des bandes de vibration caractéristiques du PLGA et du GNL également présentes pour F1 et F3.	17071
Figure 60. Dérivées premières des spectres infrarouges du GNL et de F3.	17273
Figure 61. Principe du dosage enzymatique du tréhalose.	17374
Figure 62. Analyses par spectroscopie UV-Visible des matières premières et NPs.	175
Figure 63. Viabilité cellulaire des SLNs et des NPs chargées ou non.	178
Figure 64. Internalisation des NPs chargées en Nile Red.	179
Figure 65. Rôle de la protéine LC3 dans l'autophagie.	180
Figure 66. Contrôle des propriétés d'induction de l'autophagie des SLNs et des NPs chargées et non chargées par immunoblotting.	181
Figure 67. Contrôle des propriétés d'induction du flux autophagique des SLNs et des NPs chargées ou non par l'utilisation d'une sonde fluorescente.	182

Listes des tableaux :

Tableau 1. Exemples de traitements invasifs.	23
Tableau 2. Quelques exemples des effets neuroprotecteurs du tréhalose in vitro.	39
Tableau 3. Quelques exemples des effets neuroprotecteurs du tréhalose in vivo.	40
Tableau 4. Les différents types d'émulsions.	48
Tableau 5. Tests de solubilité du GNL et du dATr dans le THF, le Miglyol® 812 et l'eau déionisée.	160
Tableau 6. Caractérisation physico-chimique (taille, PDI et potentiel zêta) des différentes formulations (NPs et SLNs) en fonction du procédé de formulation.	163

Listes des box :

BOX 1 : Décarboxylation enzymatique de la L-Dopa.	26
BOX 2 : Les transports membranaires.	45
BOX 3 : Déprotection d'éther de silyle au moyen de TBAF.	153
BOX 4: Principe des analyses par Dynamic Light Scattering (DLS).	167

ABRÉVIATIONS

ABC	<i>ATP binding cassette</i> / Transporteurs à cassettes liant l'ATP
Ac	Acétyle
ACN	Acétonitrile
Aq.	Aqueux
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP-glucose	Adénosine diphosphate glucose
AFM	<i>Atomic force microscope</i> / Microscope à force atomique
ALP	<i>Autophagy-lysosome pathway</i> / Autophagie par les lysosomes
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> / Protéine kinase activée par l'AMP
AP	Autophagosomes
ARN	Acide ribonucléique
Atg	<i>Autophagy-related genes</i> / gènes reliés à l'autophagie
ATP	Adénosine triphosphate
Azdt	5'azidothymidine
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CAL-B	<i>Candida antarctica B</i>
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDP-DAG	Cytidine diphosphate diacylglycérol
COMT	Catéchol- <i>O</i> -méthyltransférase
CuAAC	Cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre
dATr	Diacyle tréhalose
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC	<i>N,N</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DCU	dicyclohexylurée
DDC	DOPA-décarboxylase
DL	<i>Drug Loading</i> / Taux d'encapsulation
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> / Diffusion dynamique de la lumière
DIC	<i>N,N</i> -diisopropylcarbodiimide

diC16-dT	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate-deoxythymidine
DLPU	1,2-Dilauroyl-phosphatidyluridine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DOTAP	Chlorure de <i>N</i> -[1-(2,3-dioleoyloxy)-propyl]- <i>N'</i> , <i>N'</i> , <i>N'</i> -triméthylammonium
DOTAU	Tosylate de <i>N</i> -[5'-(2',3'-dioleoyl)uridine]- <i>N'</i> , <i>N'</i> , <i>N'</i> -triméthylammonium
DOUPC	1,2-Dioléoyluridinophosphocholine
EDC	<i>N</i> -éthyl- <i>N</i> -(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EE	<i>Encapsulation efficiency</i> / Efficacité d'encapsulation
EMA	Agence européenne des médicaments
Et	Éthyle
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> / Protéine fluorescente verte
GNBA	Glyconucléobolaamphiphiles
GNL	Glyconucléolipides
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
h	Heure
HRMS	<i>High-resolution mass spectrometry</i> / Spectroscopie de masse haute résolution
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
IMN	Institut des Maladies Neurodégénératives
IR	Infrarouge
ISM	Institut des Sciences Moléculaires
LAMPs	<i>Lysosome-Associated Membrane Proteins</i>
LBs	<i>Lewy Bodies</i> / Corps de Lewy
LC3	<i>Light chain 3</i> / Chaîne légère 3
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> / Lipoprotéine de faible densité
L-Dopa	3,4-dihydroxyphénylalanine

LRRK-2	Leucine-Rich Repeat Kinase 2
Me	Méthyle
MPP⁺	1-méthyl-4-phényl pyridinium
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i> / Cible de la rapamycine chez les mammifères
NL	Nucléolipide
NPs	Nanoparticules
OMS	Organisation mondiale de la santé
OtsA	Tréhalose-6-phosphate synthase
OtsB	Tréhalose-6-phosphate phosphatase
PdI	<i>Polydispersity index</i> / Indice de polydispersité
PEG	Polyéthylène glycol
PLGA	<i>Poly(lactic-co-glycolic acid)</i> / Poly(acide lactique-co-glycolique)
PVP-I	Poly(vinylpyrrolidone)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMT	<i>Receptor-mediated transcytosis</i> / Transcytose médiée par les récepteurs
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> / Microscopie électronique à balayage (MEB)
SLC	<i>Solute carrier</i> / Transporteur de soluté
SLNs	<i>Solid lipid nanoparticles</i> / Nanoparticules solides lipidiques
SN2	Substitution nucléophile de type 2
SNC	Système nerveux central
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
STEM	<i>Scanning transmission electron microscopy</i>
T.A.	Température ambiante
TBAF	<i>Tetra-n-ButylAmmonium Fluoride</i> / Fluorure de tetrabutylammonium
TBDMSCl	Chlorure de <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
^tBuOH	<i>Tert</i> -butanol

TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> / Microscopie électronique à transmission (MET)
TFEB	<i>Transcription Factor EB</i> / Facteur de transcription EB
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Triméthylsilyle
UDP-Glucose	Uridine Diphosphate Glucose
US	Ultrasons
UT	<i>Untreated</i> / Non traitées
UV-Vis	Ultraviolet-visible
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
E/H	Eau dans huile
λ	Longueur d'onde

INTRODUCTION

Le développement de nouveaux traitements contre les maladies neurodégénératives est l'un des plus gros enjeux de la recherche médicale actuelle. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) prédit que ces maladies deviendront la deuxième cause d'invalidité la plus répandue dans les vingt prochaines années en raison du vieillissement de la population [1,2]. Pour l'instant, aucun traitement curatif n'est disponible et ceux qui sont proposés ne font qu'atténuer les symptômes de ces maladies (comme Alzheimer, Parkinson, ou encore la sclérose latérale amyotrophique). La complexité à promouvoir de nouveaux traitements contre ces troubles neurodégénératifs peut s'expliquer par l'obstacle que constitue le franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui protège le cerveau de l'intrusion d'un grand nombre de molécules extérieures pathogènes, mais aussi, malheureusement, de potentielles substances thérapeutiques ...

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont proposé l'utilisation des nanotechnologies pour faciliter l'administration de substances actives au sein du système nerveux central (SNC) à la fois pour le traitement et le diagnostic de ces maladies. Les nanotechnologies, comme leur nom l'indique, utilisent des matériaux et des dispositifs à l'échelle nanométrique qui leur confère des propriétés spécifiques qui en font tout leur intérêt. Elles regroupent une grande variété de nano-objets tels que les liposomes, les nanoémulsions, les nanoparticules (organiques et inorganiques), les nanoparticules solides lipidiques (SLN : *solid lipid nanoparticles*) entre autres. Pour ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à des matériaux bio-inspirés et biocompatibles constitués de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) et de nucléolipides dans le cadre du traitement de la maladie de Parkinson.

Ce projet de recherche s'articule autour de trois grandes parties :

La première établit un état de l'art abordant des notions clés à savoir une description de la maladie de Parkinson et les actuelles voies de traitements. Parmi celles-ci, les nanotechnologies et plus précisément les nanoémulsions, les nanoparticules de PLGA et les nanoparticules solides lipidiques seront décrites dans le cadre du traitement des maladies neurodégénératives. Une attention particulière sera portée aux nucléolipides, molécules bio inspirées aux propriétés uniques d'auto-assemblages, pouvant être utilisée pour la formation de nano-objets à but thérapeutiques.

La deuxième s'intéresse aux propriétés acides des nanoparticules de PLGA en tant que substance active. En effet, les nanoparticules de PLGA améliorent grandement la survie

cellulaire *in vitro* et *in vivo* sur des modèles de la maladie de Parkinson, grâce à leur capacité de réacidification du pH lysosomal et d'activation de l'autophagie par les lysosomes (**Figure 1**).

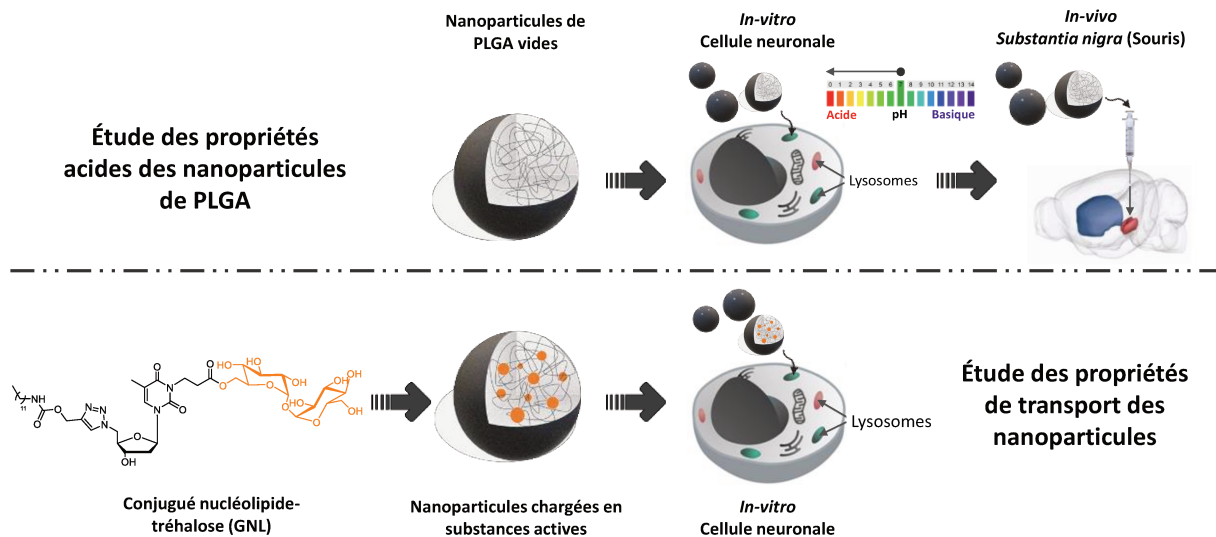


Figure 1. Les deux voies de recherches étudiées dans ce projet. En haut, la première voie d'étude a porté sur l'étude des propriétés d'acidification des nanoparticules de PLGA (test *in vitro* et *in vivo*). En bas, la seconde voie d'étude s'est intéressée à l'utilisation de nanoparticules pour le transport d'une substance active au sein des neurones.

Le dernier axe décrit le développement et la synthèse de dérivés lipidiques du tréhalose, notamment les GlycoNucléoLipides (GNL), ainsi que leur formulation soit sous forme de nanoparticules de PLGA soit sous forme de nanoparticules solides lipidiques, pour la délivrance d'une substance active (le tréhalose) au sein de modèles *in vitro* pour évaluer leur potentiel thérapeutique en particulier leurs propriétés d'induction de l'autophagie.

ÉTAT DE L'ART

Chapitre I : La maladie de Parkinson

1- Définition et épidémiologie

La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue après la maladie d'Alzheimer au niveau mondial. Bien que sa cause soit encore inexpliquée, dans la majorité des cas elle apparaît généralement avec l'âge et se déclare le plus souvent autour de 70 ans. Elle touche de 6,5 à 10 millions de personnes dans le monde, dont environ 200 000 personnes en France avec plus 25 000 nouveaux cas par an [3]. La maladie de Parkinson se caractérise par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques situés dans la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) du cerveau (**Figure 2**). Cette dégénérescence entraîne une déplétion en dopamine, un neurotransmetteur du système nerveux central intervenant notamment au niveau des neurones chargés de contrôler les mouvements du corps humain. Ainsi, des troubles du mouvement affectant la marche ou encore la posture surviennent et reflètent l'atteinte de la *substantia nigra*, du striatum et des autres régions cérébrales [4].

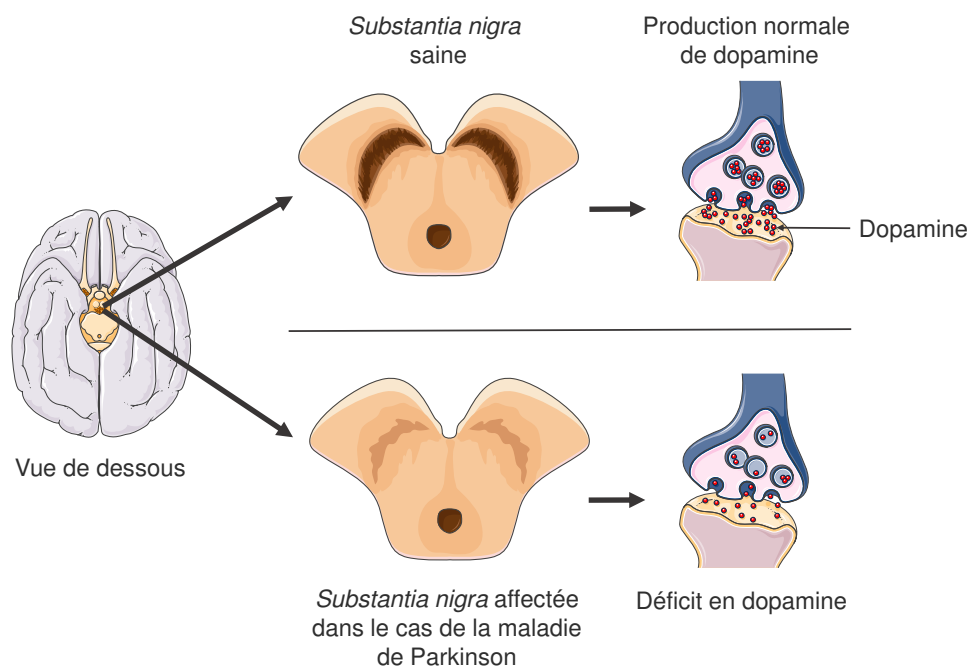


Figure 2. La maladie de Parkinson. La maladie de Parkinson se caractérise par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques situés dans la *substantia nigra pars compacta* du cerveau.

2- Manifestations cliniques

La maladie de Parkinson est une maladie chronique, d'évolution lente et progressive, et le plus souvent divisée en trois phases : préclinique, prodromique et symptomatique, cette dernière comportant cinq stades (**Figure 3**) [5].

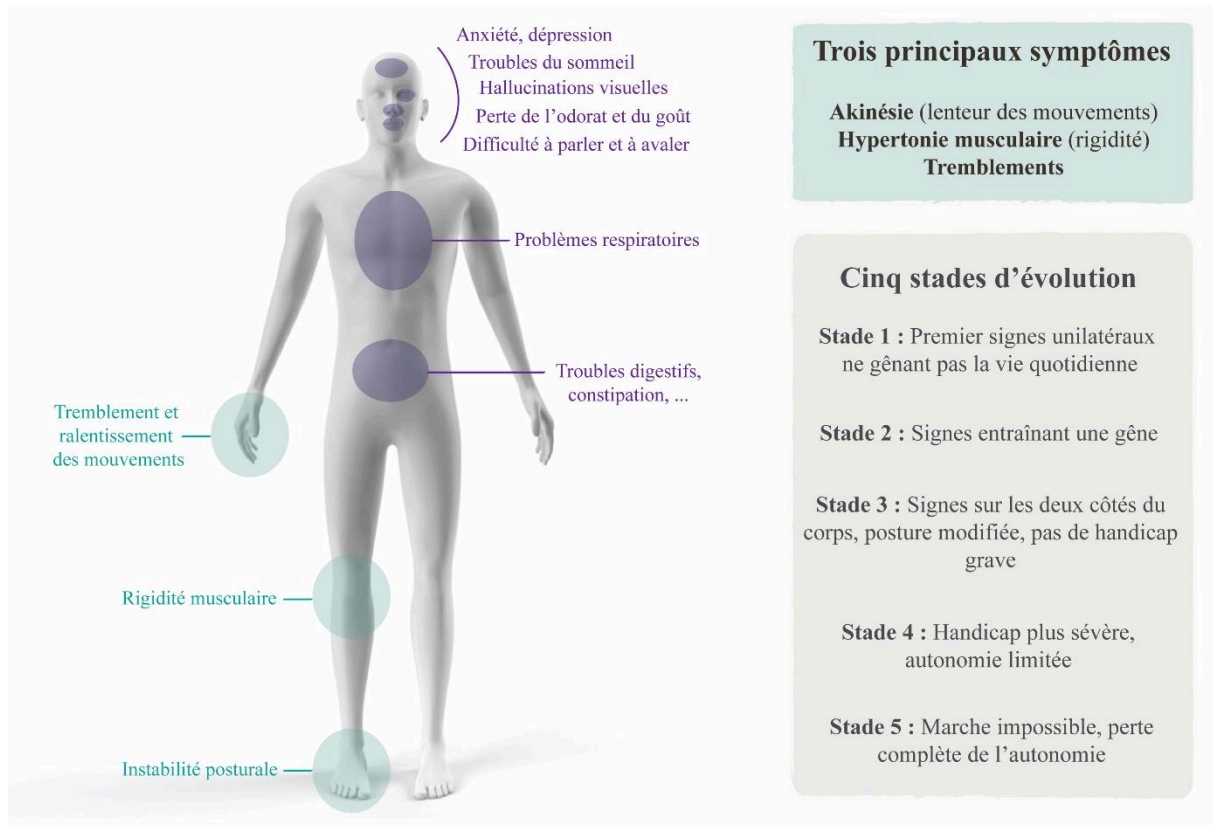


Figure 3. Les différents symptômes et étapes de la maladie de Parkinson. *La maladie de Parkinson est une maladie chronique pouvant être caractérisée et divisée en trois phases : la phase préclinique, la phase prodromique et la phase symptomatique elle-même divisée en cinq stades* [6].

La première phase, ou phase préclinique, est dite asymptomatique car la diminution de dopamine est compensée par des processus de plasticité neuronale qui permettent de créer, défaire ou réorganiser les réseaux de neurones et leurs connexions. Ainsi, les patients présentent un fonctionnement cérébral normal et restent asymptomatiques jusqu'à ce que 50 à 70% des neurones dopaminergiques soient détruits et que le cerveau ne soit plus en mesure de compenser [7].

La deuxième phase, ou phase prodromique, est la période durant laquelle un ensemble de symptômes non moteurs avant-coureurs, généralement bénins, apparaissent et annoncent de

fait la survenue de la phase symptomatique. Dans le cas de la maladie de Parkinson, ces symptômes peuvent se traduire par des troubles du sommeil, une dépression ou encore de l'anxiété [4,8].

Enfin, la phase symptomatique se caractérise par l'apparition nette de symptômes moteurs caractéristiques. Le diagnostic de la maladie de Parkinson repose alors sur la manifestation de quatre principaux symptômes moteurs : les tremblements au repos, l'akinésie (définie par une lenteur dans l'initiation des mouvements pouvant aller jusqu'à l'immobilité), l'hypertonie ou raideur musculaire, et enfin une instabilité posturale. Par ailleurs, ces symptômes peuvent longtemps rester asymétriques et ne toucher qu'un côté du corps [4,9] (**Figure 3**).

3- Étiologie de la maladie de Parkinson

Bien que l'âge soit considéré comme le principal facteur de risque, la maladie de Parkinson est multifactorielle et les causes exactes de sa survenue restent encore inconnues. Certains facteurs génétiques et environnementaux seraient à l'origine de la dégénérescence des neurones dopaminergiques [10]. L'interaction entre les facteurs environnementaux et génétiques est aujourd'hui très largement étudiée et apporte de nouvelles données cruciales pour la compréhension du fonctionnement de la maladie [11].

Tout d'abord, des facteurs de risques environnementaux, notamment en milieu rural et dans le secteur agricole [12,13] seraient liés à l'utilisation de pesticides organochlorés et d'herbicides comme le paraquat (herbicide) [14], la roténone (insecticide) [15], le MPP⁺ (1-méthyl-4-phényl pyridinium, herbicide) ou encore le MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine, un neurotoxique précurseur du MPP⁺) [16]. Ils seraient à l'origine de 95% des cas de maladie de Parkinson, cas dits sporadiques. Le MPTP est un dérivé de la mépéridine connue pour ses effets similaires à ceux de l'héroïne ou de la morphine. Sa présence dans la formulation de certains stupéfiants s'est notamment révélée toxique pour les neurones dopaminergiques. En 1979, on l'a en effet reconnu responsable de syndromes parkinsoniens chez de jeunes toxicomanes [17]. Néanmoins, d'autres facteurs environnementaux, tels que le tabac ou le café, semblent quant-à-eux posséder un effet positif et neuroprotecteur [18].

D'un point de vue génétique (formes familiales de la maladie), vingt-et-un variants génétiques associés à la maladie de Parkinson ont à ce jour été identifiés par des études épidémiologiques sur différentes cohortes [19]. Celles-ci ont contribué à la découverte de

formes monogéniques de la maladie qui touchent par exemple le gène *SNCA* codant pour de l' α -synucléine, le gène *LRRK-2* (*Leucine-Rich Repeat Kinase 2*) ou encore des facteurs de risque, tels que le gène de la glucocérébrosidase (*GBA*) [20]. Toutefois, il est estimé en l'état actuel des connaissances que seuls 5 à 10 % des cas de maladie de Parkinson seraient d'origine génétique [21].

4- Traitements

Les traitements de la maladie de Parkinson proposés ne sont, à l'heure actuelle, que symptomatiques et peuvent être à la fois non-médicamenteux ou médicamenteux. Les moyens non médicamenteux se concentrent sur l'hygiène de vie, la rééducation fonctionnelle, la chirurgie fonctionnelle ou encore la psychothérapie. Les moyens médicamenteux se classent en deux catégories : celle des médicaments anti-parkinsoniens (tels que la Lévodopa, des agonistes dopaminergiques, ...) ou celle des médicaments traitants les troubles associés à la maladie [22].

4.1- Thérapies fonctionnelles et invasives

Afin d'améliorer certains troubles de la maladie de Parkinson, notamment les troubles moteurs, différentes méthodes de rééducation, dites thérapies fonctionnelles (telles que la rééducation orthophonique ou la kinésithérapie) sont employées pour stimuler les muscles faciaux et combattre l'akinésie ainsi que les troubles de coordination par des exercices actifs se focalisant sur les différents paramètres du mouvement (équilibre, amplitude, vitesse, coordination) [23,24]. La chirurgie peut également être envisagée (**Tableau 1**).

Tableau 1. Exemples de traitements invasifs.

	Avantages	Inconvénients
Stimulation cérébrale profonde	Réversible Indiqué en cas de troubles comportementaux dopa-induits Coût	Contre indiquée en cas de troubles cognitifs Complications liées à la chirurgie
Pompe à apomorphine	Réversible Possible en cas de troubles cognitifs Coût	Nécessite une infirmière à domicile Contraintes liées au dispositif
Pompe à lévodopa	Possible en cas de troubles cognitifs	Irréversible Complications liées à la chirurgie Nécessite une infirmière à domicile Contraintes liées au dispositif

La stimulation cérébrale profonde, ou neurostimulation, reste invasive et agressive et n'est proposée qu'à 5 à 10% des patients parkinsoniens [25]. Elle consiste à envoyer des impulsions électriques, déclenchées par un neurostimulateur, directement vers les différentes zones cérébrales (noyau sous-thalamique) responsables des troubles du mouvement (tremblements, akinésie, ...) (**Figure 4**).

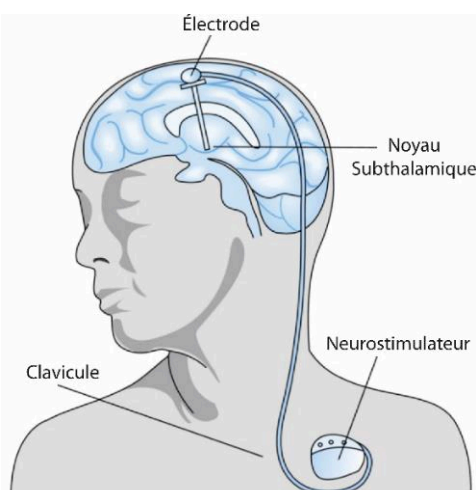


Figure 4. La neurostimulation cérébrale profonde. *La neurostimulation est une technique invasive consistant à envoyer des impulsions électriques, déclenchées par un neurostimulateur, directement vers les différentes zones cérébrales responsables des troubles du mouvement [26].*

La neurostimulation permet de désynchroniser les neurones afin de relancer une activité normale du noyau sous-thalamique, car c'est la synchronisation des neurones qui est à l'origine d'une partie des symptômes moteurs liés à la maladie de Parkinson [27]. La pompe à apomorphine quant à elle permet l'administration d'une dose continue et lente d'apomorphine, une molécule de synthèse très proche de la dopamine, chez des patients parkinsoniens présentant des fluctuations motrices et d'hyperkinésie ou de dyskinésies sévères. Elle permet ainsi de conserver une fenêtre thérapeutique optimale par une injection sous-cutanée d'apomorphine présentant une résorption complète et rapide, permettant ainsi de parvenir au cerveau en moins de 10 minutes [28]. Enfin, la pompe lévodopa ou duodopa est utilisée à un stade de la maladie pour lequel les fluctuations motrices sont sévères et lorsque le traitement par pompe à apomorphine est inefficace. Par ailleurs, elle est également prescrite lorsque les patients présentent une contre-indication médicale à la stimulation cérébrale profonde [29].

4.2- Thérapies médicamenteuses

L'administration de substances inhibitrices de la dégradation de la dopamine pour maintenir une concentration élevée en dopamine sur une plus longue durée, l'administration d'agonistes de la dopamine ou encore l'administration d'un précurseur de la dopamine, sont autant de voies thérapeutiques utilisées pour réguler la concentration en dopamine au sein du SNC [30]. Le médicament le plus connu pour lutter contre la maladie de Parkinson est la 3,4-dihydroxyphénylalanine plus communément appelé L-Dopa ou Lévodopa [31]. Sa décarboxylation par la DOPA-décarboxylase (DDC) entraîne la libération de dopamine (**Box 1**). Cependant, du fait de sa métabolisation importante une trop faible quantité de Lévodopa administrée atteint le cerveau. La L-Dopa est alors associée à des inhibiteurs des enzymes métaboliques comme la carbidopa, un inhibiteur de la DDC périphérique et l'entacapone, un inhibiteur spécifique et réversible de la catéchol-*O*-méthyltransférase (COMT). La demie vie de la Lévodopa dans le cerveau est donc ainsi augmentée grâce à la diminution de sa métabolisation périphérique (**Figure 5**) [32].

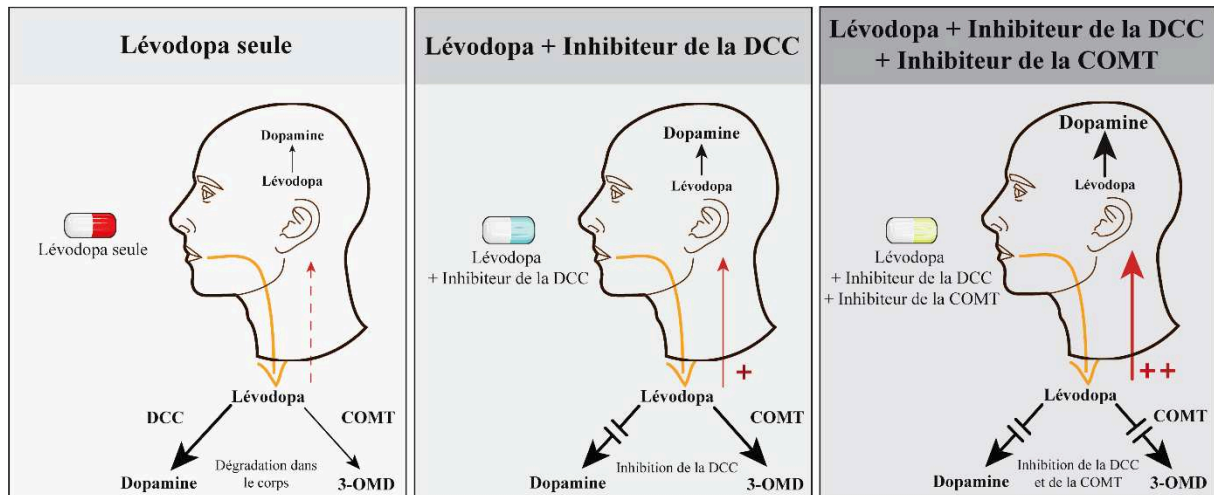
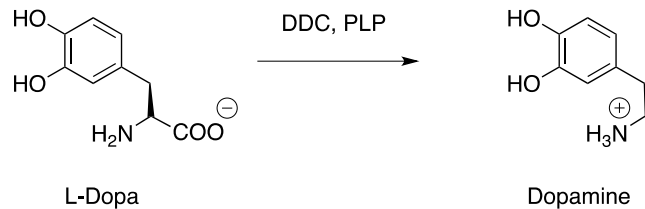


Figure 5. Stratégies thérapeutiques pour l'augmentation de la demi-vie de la Lévodopa. Avantages de la co-formulation de la Lévodopa avec des inhibiteurs de la DCC et de la COMT afin d'augmenter sa biodistribution et d'éviter son métabolisme en dopamine et 3-O-Methylodopa (3-OMD) à l'extérieur du cerveau. Adapté de Gordin et al. [33].

Même si la Lévodopa reste la molécule la plus utilisée et la plus efficace pour la prise en charge de la maladie de Parkinson, celle-ci n'est pas exempte d'effets secondaires. D'une part, son efficacité décroît avec le temps, d'autre part de nouveaux symptômes moteurs (mouvements anormaux involontaires et contractions involontaires des muscles) et des complications peuvent apparaître comme des vomissements, une anorexie, une hypotension orthostatique (chute de la pression artérielle lors du passage de la position allongée à la position debout) [34]. Afin de soulager ces effets secondaires, des traitements alternatifs, actuellement en cours d'étude, agissent directement au niveau des récepteurs dopaminergiques *via* l'utilisation d'agonistes de la dopamine à longue demi-vie [35]. Depuis quelques années, une substance active neuroprotectrice, le tréhalose, fait l'objet d'un intérêt croissant en recherche [36]. Cette molécule améliore la clairance de l'agrégation anormale des protéines dans plusieurs contextes pathologiques, et permet le rétablissement de l'autophagie lysosomale. Cette propriété permet d'envisager une nouvelle stratégie thérapeutique prometteuse pour le traitement de la maladie de Parkinson [37].

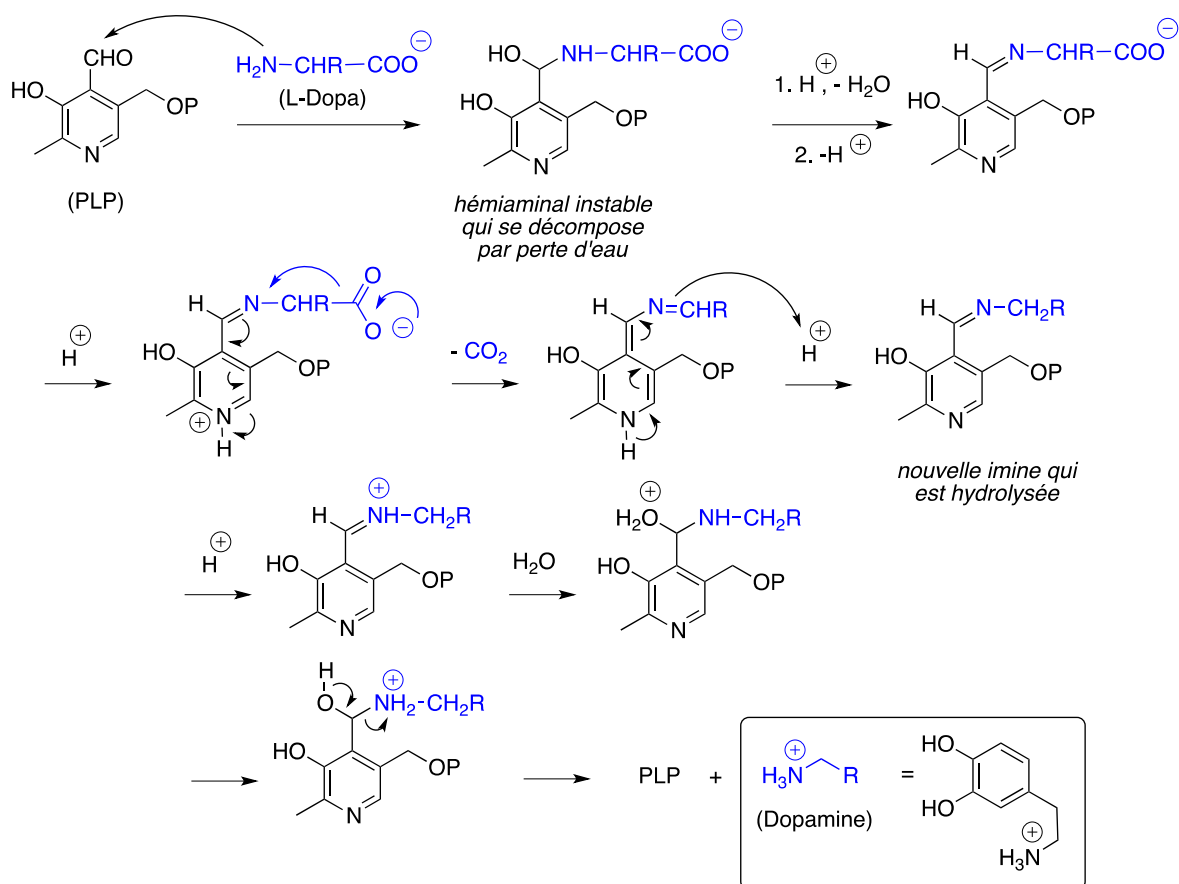
BOX 1 : Décarboxylation enzymatique de la L-Dopa

La cellule est une micro usine chimique qui travaille en conditions contraintes (milieu aqueux, pH physiologique, température constante de 37°C) dans lesquelles certaines réactions se font de manière enzymatique. En l'occurrence, la décarboxylation de la L-Dopa en dopamine utilise la L-Dopa décarboxylase (DDC, EC 4.1.1.28) associée à un cofacteur enzymatique : le phosphate de pyridoxal (PLP) [38] *.



Décarboxylation enzymatique de la L-Dopa.

Le mécanisme passe par la formation d'une première imine au niveau de laquelle s'effectue l'étape de décarboxylation, puis d'une seconde imine qui subit une hydrolyse permettant la libération de l'amine et de la PLP :



Mécanisme détaillé de la décarboxylation enzymatique de la L-Dopa.

* Dans la formule du PLP, OP désigne un groupe phosphate PO_4^{2-}

5- Physiopathologie

De nombreux mécanismes cellulaires tels que le dysfonctionnement des mitochondries, le stress oxydatif, le dysfonctionnement synaptique, l'agrégation protéique ou encore l'altération de la fonction autophagie-lysosomale sont impliqués dans la maladie de Parkinson. Dans le cadre de cette thèse, l'altération de la fonction autophagie-lysosomale en tant que cible thérapeutique dans la maladie de Parkinson a tout particulièrement été étudiée.

Découverte en 1989, l' α -synucléine est une protéine de 140 acides aminés exprimée essentiellement dans les neurones au niveau des synapses et des vésicules synaptiques [39]. À l'origine de la pathogenèse de la maladie de Parkinson, à l'intérieur des neurones dopaminergiques une accumulation anormale d' α -synucléine due à un mauvais repliement est évoquée, ainsi qu'un déficit de transmission entre neurones, de ces fibrilles. Cela entraîne la formation de dépôts et donc l'interruption de la transmission de la dopamine (**Figure 6**) [40,41].

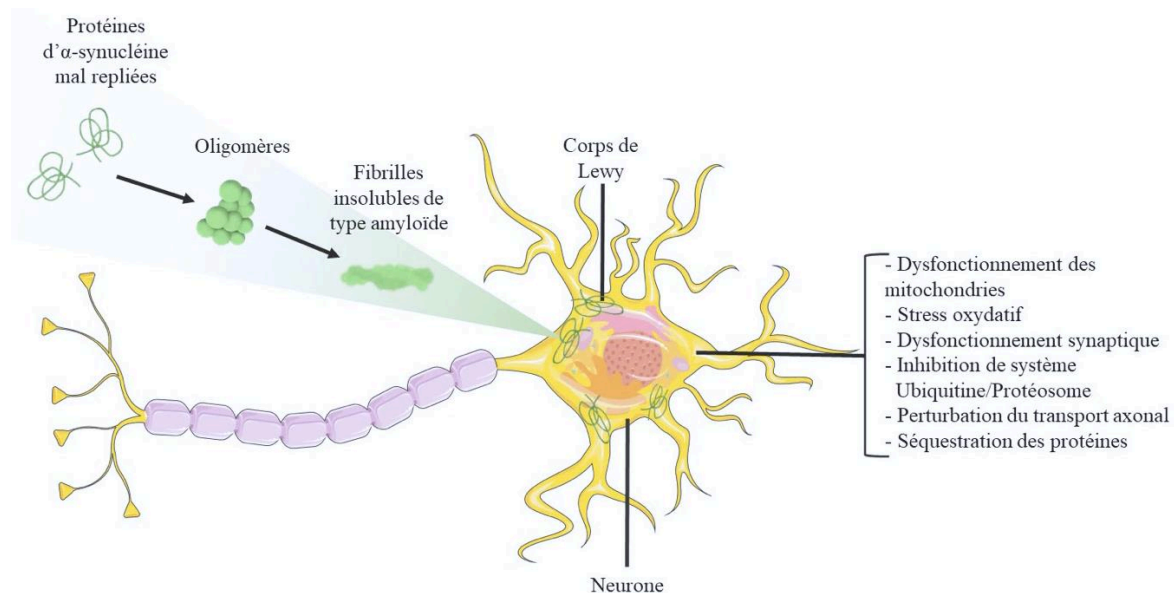


Figure 6. Les corps de Lewy. Représentation schématique d'un corps de Lewy (agrégats d' α -synucléine) dans un neurone dopaminergique et les différents mécanismes associés à la maladie de Parkinson [40,41].

En 1912 le neuropathologiste Friedrich Heinrich Lewy a découvert la présence d'inclusions intracytoplasmiques de formes sphériques, appelées "corps de Lewy" (ou *Lewy Bodies* LBs) à l'intérieur des neurones dopaminergiques de la SNpc (**Figure 6**) [42]. Les corps de Lewy ont également été identifiés dans différentes parties du cerveau telles que le tronc cérébral ou le bulbe olfactif.

Ces inclusions intracellulaires, d'un diamètre de 5 à 25 μm , possèdent une structure organisée autour d'un noyau dense, entouré de protéines. Actuellement plus de 70 protéines composant les corps de Lewy ont pu être identifiées [43] dont l'ubiquitine, la parkine, la cathepsine D et l' α -synucléine [44,45] reconnue comme en étant le constituant principal. Les protéines nouvellement traduites sont soumises à un repliement approprié pour assurer leur fonction. Ainsi lorsque celui-ci n'est pas correctement effectué ou s'il est empêché, notamment dans le cas des maladies neurodégénératives, les protéines ne peuvent assurer leur fonction biologique et ont tendance à s'agréger pour des raisons thermodynamiques (diminution de l'enthalpie libre entre la conformation native et un état non replié) [46]. Ces structures protéiques agrégées sont ainsi retrouvées dans de nombreuses maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson.

La propagation et la neurodégénérescence, en dehors de la SNpc, peuvent s'expliquer notamment par le transfert de la protéine elle-même ou des dépôts d' α -synucléine entre cellules et au sein de la synapse [47]. Cette propagation serait à l'origine de l'apparition des symptômes cognitifs observés chez les patients parkinsoniens. Ces symptômes sont encore aujourd'hui difficiles à traiter mais l'identification de ce mécanisme ouvrent la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques ciblant l' α -synucléine [48].

Afin de limiter la propagation des agrégats toxiques d' α -synucléine, le développement de voies passives et actives d'immunothérapies sont en cours d'étude. Ainsi, l'immunothérapie utilisant des anticorps pour le ciblage de l' α -synucléine s'est avérée efficace sur divers modèles animaux et lors d'essais cliniques récents [49]. Une autre voie thérapeutique consiste à utiliser de petites molécules capables de bloquer ou de moduler l'agrégation d' α -synucléine ou de composés régulant à la hausse les voies intrinsèques cellulaires, telles que la voie de l'autophagie-lysosomale (ALP : *Autophagy Lysosome Pathway*). Les lysosomes sont des organites cellulaires, constitués de 50 à 60 hydrolases actives à pH acide (4,5-5,0), destinées à dégrader les molécules intracellulaires et entourées par une membrane simple composé de glycoprotéines (*Lysosome-Associated Membrane Proteins* (LAMPs)) (**Figure 7**) [50]. Des études expérimentales et cliniques indiquent qu'une défaillance de la voie de l'autophagie, et notamment des lysosomes, jouerait un rôle important dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson [51–53].

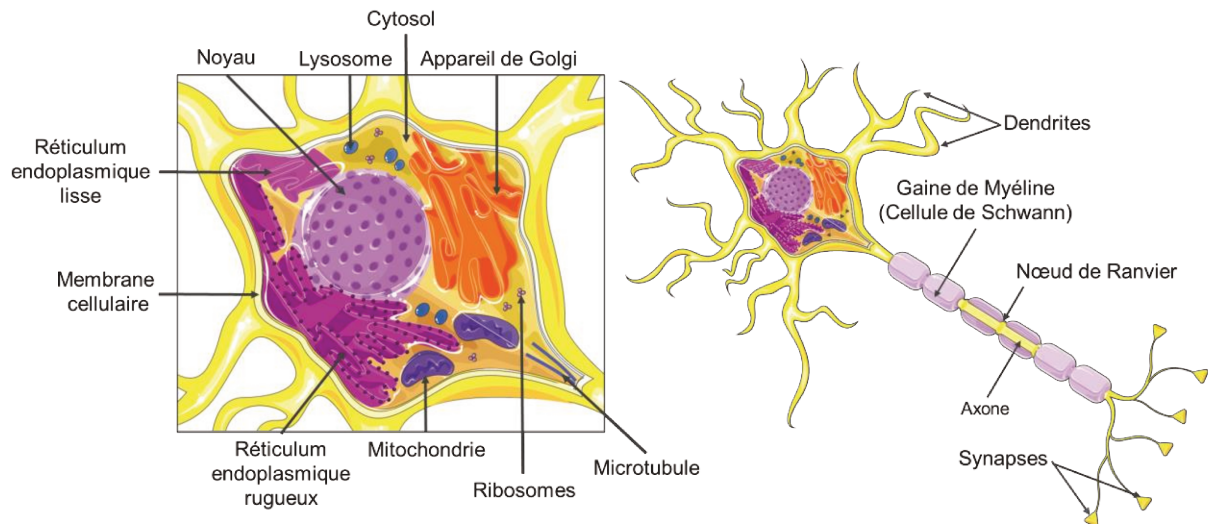


Figure 7. Représentation schématique d'un neurone. *Compositions intérieure (gauche) et extérieure (droite) d'un neurone.*

5.1- Autophagie : Voie cellulaire de dégradation de protéines et organites

Le terme « autophagie » provient du grec *auto* (soi-même) et *phagein* (manger), signifiant ainsi de manière littérale « se manger soi-même » [54]. L'autophagie est un mécanisme physiologique intracellulaire d'autodigestion indispensable à la vie cellulaire qui permet une protection des cellules *via* la dégradation d'éléments cellulaires indésirables tels que des protéines mal repliées, des pathogènes ou encore des organites [55]. En 1974, le professeur Christian de Duve a reçu le prix Nobel de médecine pour sa découverte du lysosome en 1955. Suite aux travaux du Pr. Ohsumi, récompensés par le prix Nobel de médecine en 2016, les gènes essentiels à l'autophagie ainsi que l'implication de nombreuses kinases appelées « atg » (*AuTophagy related*) ont pu être identifiés [54]. Il existe 3 formes d'autophagie : la microautophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes et la macroautophagie [56–58].

5.2- Les différentes formes d'autophagie

La microautophagie permet, par l'invagination de la membrane lysosomale, la séquestration d'une partie du matériel cytosolique. Elle correspond donc à une voie non sélective de l'autophagie contrairement à l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (Hsc70) et co-chaperonnes (hip, hop, hsp40, hsp90 et bag1) qui elle est hautement spécifique (**Figure 8**) [59–61].

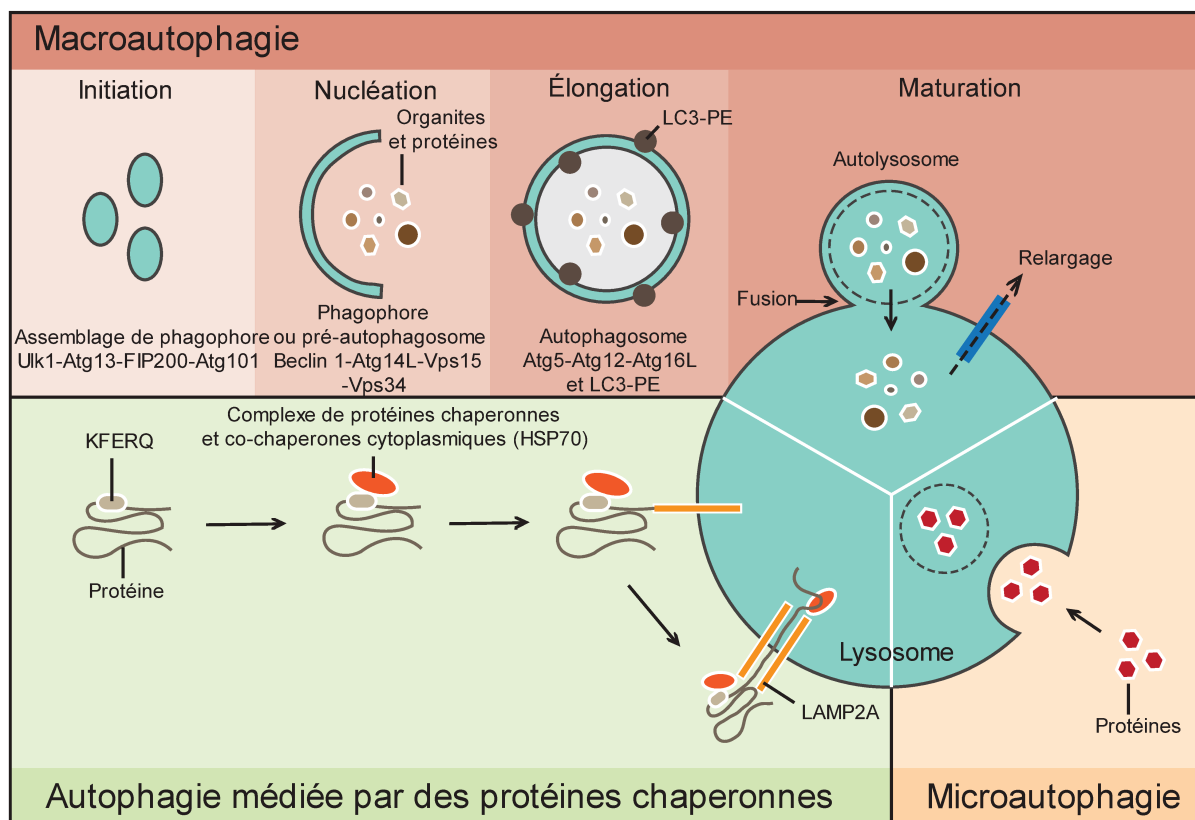


Figure 8. Les trois formes d'autophagie. Les différents mécanismes d'autophagie à savoir la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes. Les différentes protéines liées à l'autophagie sont également répertoriées. Adapté de Ho et al. [62].

Dans le cas de l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes, les protéines partiellement dégradées et possédant une séquence penta-peptidique spécifique (KFERQ) sont reconnues par les protéines chaperonnes et co-chaperonnes. Le complexe ainsi formé est dirigé vers des récepteurs spécifiques de la membrane lysosomale, tels que LAMP-2A, permettant le passage à l'intérieur du lysosome (**Figure 8**) [63].

Enfin, la macroautophagie est la forme principale d'autophagie et aussi la moins sélective. Ce processus débute par la formation de « phagophores », à partir de vésicules appelés phagosomes provenant de la membrane du réticulum endoplasmique, dont l'assemblage et la séquestration de composants cytoplasmiques divers, tels que des organites ou protéines à dégrader, forment les « autophagosomes ». L'autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome afin de former un « autolysosome » dans lequel plusieurs enzymes lysosomales digèrent les différents éléments cytoplasmiques. Ainsi, la macroautophagie génère

des nucléotides, des acides aminés et des acides gras libres qui pourront être réutilisés pour la synthèse de nouvelles macromolécules et d'énergie (adénosine triphosphate, ATP) (**Figure 8**) [60,64,65].

Enfin, la protéine mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) joue un rôle-clé dans la régulation de la macroautophagie [66]. Il s'agit d'une protéine kinase conservée au cours de l'évolution qui favorise la croissance, la prolifération, ainsi que la survie cellulaire. Lorsqu'elle est activée, la protéine mTOR inhibe la voie de l'autophagie, mais son inactivation, par exemple à la suite d'une carence en nutriments, permet de lever l'inhibition et donc de relancer l'autophagie.

5.3- Autophagie dans le cas de la maladie de Parkinson

Une défaillance de la fonction lysosomale a été signalée comme facteur commun dans plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie de Huntington, d'Alzheimer et de Parkinson [67]. Des défauts de mécanisme autophagique peuvent survenir à différents stades, notamment durant la formation, la fusion et la clairance d'autophagosomes ou la reconnaissance et la dégradation d'éléments cellulaires. Dans le cas de la maladie de Parkinson, un dysfonctionnement des mécanismes de contrôle des protéines, notamment dû au vieillissement, participe à la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Lors des premiers stades d'apparition des agrégats, une augmentation de l'activité autophagique permet d'éliminer ces amas indésirables. Avec l'âge, l'efficacité de l'autophagie diminue grandement et l'élimination des agrégats voire des corps de Lewy n'est alors plus suffisante [60]. Toutefois, certaines substances actives sont capables de rétablir l'autophagie et donc la dégradation des éléments toxiques à l'intérieur des neurones. Ainsi, la conception de traitements thérapeutiques visant à délivrer ces substances actives au sein du SNC pourrait s'avérer intéressante pour lutter contre les mécanismes dégénératifs.

Chapitre II : Le tréhalose, une substance active prometteuse

Le tréhalose ou α -D-glucopyranosyl-1,1- α -D-glucopyranoside, est un disaccharide non réducteur. D'origine naturelle, il est présent chez les invertébrés [68] tels que les plantes, ou en petite quantité dans le miel, le homard, le pain ou d'autres aliments fermentés, produits à partir des levures boulangères ou de la bière (**Figure 9**).

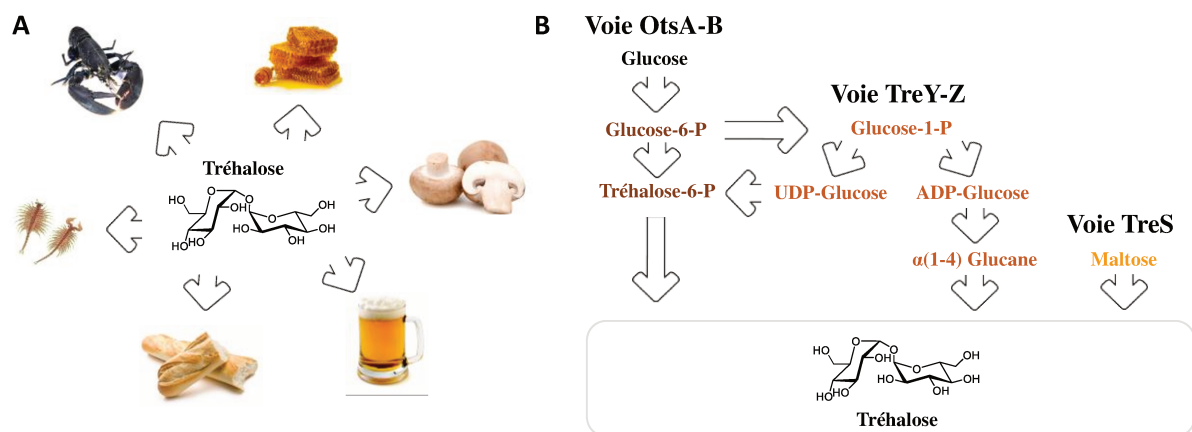


Figure 9. Le tréhalose une substance active aux diverses origines. Origines naturelles (A) et voies synthétiques (B) d'obtention du tréhalose.

Au cours de l'évolution, les mammifères ont perdu leur capacité naturelle à synthétiser le tréhalose [69]. Néanmoins, il peut être obtenu de façon synthétique à partir d'enzymes selon trois voies principales (**Figure 9**) :

- Le transfert du glucose de l'UDP-Glucose (Uridine Diphosphate Glucose) vers le glucose-6-phosphate par la tréhalose-6-phosphate synthase (OtsA) qui permet d'obtenir le tréhalose-6-phosphate. Sous l'action de la tréhalose-6-phosphate phosphatase (OtsB), le groupement phosphate est libéré et génère le tréhalose [70].
- La voie de synthèse de tréhalose par l'enzyme TreY-Z permet l'isomérisation et l'hydrolyse d'un α (1,4)-glucane obtenu préalablement à partir d'ADP-glucose (adénosine diphosphate glucose) comme donneur de glucosyle.
- La voie utilisant l'enzyme TreS conduit au tréhalose après isomérisation du maltose.

Le tréhalose possède une grande stabilité chimique grâce à sa liaison 1,1-glycosidique, qui le protège des réactions de glycosylation et l'empêche d'être métabolisé. De plus, son hydrolyse en unités glucose n'est possible qu'en présence de tréhalase, une enzyme qui réside dans des emplacements spécifiques, tels que la muqueuse intestinale, le cerveau, les reins ainsi que le foie. Dès lors, c'est la tréhalase intestinale qui est responsable de la dégradation rapide du tréhalose ingéré [71].

Le tréhalose est utilisé dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires en tant qu'additif dans les levures, agent conservateur pour les vaccins ou encore cryoprotecteur pour des organes en attente de transplantation. Il a été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2000 et a également reçu le statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) [68]. Par ailleurs, il agit comme bioprotecteur des cellules contre une grande variété de conditions environnementales, notamment la chaleur, le froid, l'oxydation, la déshydratation et la dessiccation [72]. En effet, Hernandez *et al.* ont récemment montré *in vitro* que des gouttes ophtalmiques à la fois composés de hyaluronate de sodium et de tréhalose ont la capacité d'induire l'autophagie sur des cellules épithéliales humaines exposées à la dessiccation [73]. Il a également été montré que cette substance active peut restaurer l'autophagie altérée par une infection virale, tel que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [74], et Martinon *et al.* la propose comme traitement prophylactique contre la COVID-19 provoquée par le coronavirus SARS-CoV-2 [75]. Enfin, des études sur modèle animal ont démontré les propriétés neuroprotectrices du tréhalose. Après traitement au tréhalose, sont constatées une amélioration des dysfonctionnements moteurs et une prolongation de la durée de vie de modèle animaux de la maladie de Huntington [76] d'Alzheimer [77], et dans le cas de ce projet, de la maladie de Parkinson [78]. C'est aussi un activateur de l'autophagie et un inhibiteur de l'agrégation de protéines toxiques (à l'état natif ou dénaturé) [79]. Les propriétés neuroprotectrices du tréhalose seront décrites plus en détails dans la partie 2 de ce chapitre.

1- Mécanisme d'action du Tréhalose

Au cours des dernières années, de nombreuses hypothèses ont été émises quant aux propriétés neuroprotectrices du tréhalose et à son mécanisme d'action. Bien que très controversées, certaines études suggèrent que ce sucre permettrait la réduction des agrégats de protéines et pourrait être un activateur de l'autophagie [36]. Les trois hypothèses les plus couramment admises seront abordées dans ce manuscrit (**Figure 10**).

Parmi l'ensemble des sucres, le tréhalose possède la plus grande capacité d'hydratation [80]. Cette propriété est due à la stabilité et la flexibilité conférée par la liaison glycosidique, ce qui lui permet de se lier aux groupes polaires de certaines biomolécules. Ainsi, l'un des mécanismes suggère que le tréhalose pourrait stabiliser le repliement des protéines par exclusion des molécules d'eau environnantes. Selon cette hypothèse, le sucre formerait une couche de protection autour des protéines. Les molécules d'eau piégées entre les protéines et le tréhalose formeraient préférentiellement des liaisons hydrogène avec le sucre plutôt qu'avec la protéine, réduisant ainsi le nombre de liaisons hydrogènes protéine-solvant et les forces de solvation électrostatique. Ainsi la diminution des forces de solvation conduirait à une augmentation des interactions entre protéines et donc à une stabilisation des structures. Le tréhalose pourrait également remplacer ou piéger les molécules d'eau à la surface des protéines.

🍷 Potentiels mécanismes d'action du Tréhalose

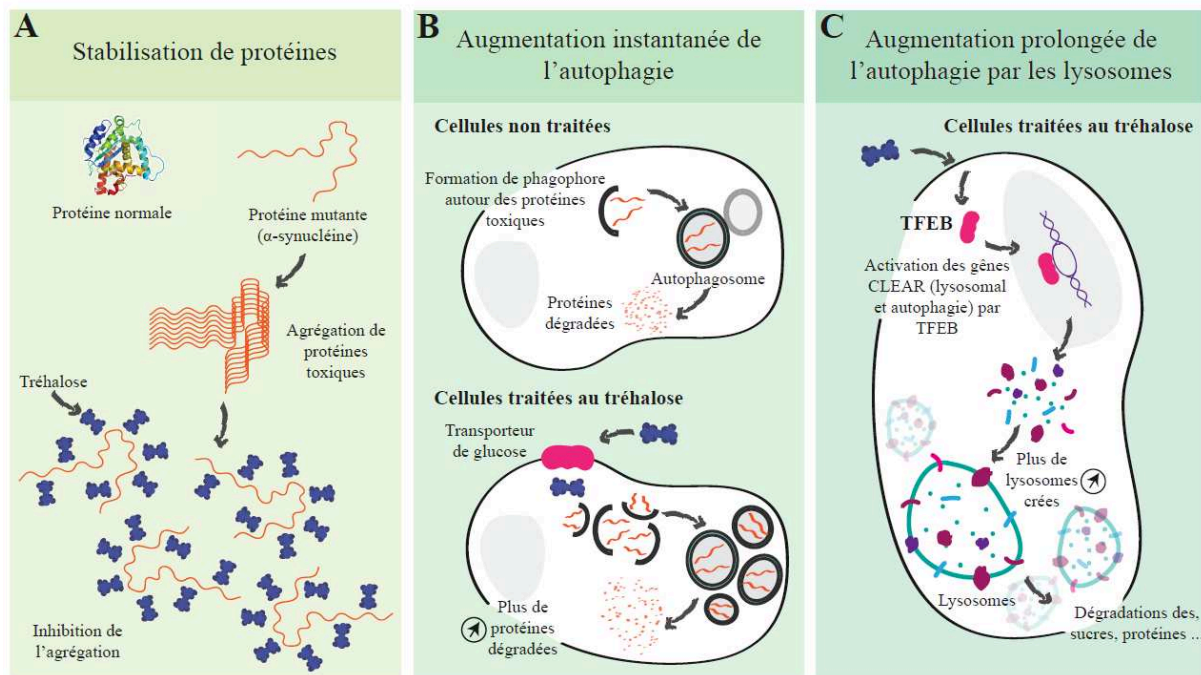


Figure 10. Potentiels mécanismes d'action du tréhalose. (A) les propriétés de stabilisation de protéines du tréhalose, (B) d'augmentation instantanée du flux d'autophagie, (C) d'augmentation prolongée du flux d'autophagie [81,82].

La deuxième hypothèse implique l'activation de l'autophagie par le tréhalose grâce à l'inhibition des transporteurs de glucose SLC2A, situés dans la membrane plasmique [81]. En effet, DeBosch et collaborateurs ont montré que le tréhalose pouvait empêcher l'absorption du glucose au sein des cellules du foie et de ce fait créer une carence (ou une famine) dans le but

de prévenir la stéatose hépatique caractérisée par l'accumulation de graisse à l'intérieur des cellules hépatiques [83]. L'état « affamé » de la cellule induirait ensuite l'autophagie hépatique.

Enfin, le tréhalose pourrait activer l'autophagie par les lysosomes via le TFEB. Il s'agit d'un gène codant (facteur de transcription EB) qui coordonne l'expression des gènes (*Becn1*, *Atg10*, *Atg12*, *Map1lc3b*, *Hspb8*, ...), protéines membranaires et hydrolases lysosomales (*Ctsb*, *Gla*, *Lamp2a*, *Mcoln1*, *Tpp1*) impliqués dans le processus de l'autophagie [79]. Dans ce cas, le tréhalose pénétrerait à l'intérieur des cellules *via* les transporteurs SLC2A8/GLUT8, puis activerait l'autophagie en agissant de manière indirecte sur l'expression du gène TFEB [84].

2- Le tréhalose pour le traitement des maladies neurodégénératives

De nombreuses études, *in vitro* et *in vivo*, ont témoigné des effets bénéfiques du tréhalose contre diverses protéinopathies, plus particulièrement les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Huntington, d'Alzheimer [77] et dans le cadre de ce projet la maladie de Parkinson [58] (**Tableau 2 et 3 en fin de chapitre**).

2.1- Tréhalose contre la maladie d'Huntington

L'un des facteurs associés à la maladie d'Huntington est l'agrégation de protéines induites par la polyglutamine, appelée *Huntingtine*. Tanaka *et al.* ont montré que de nombreux disaccharides pouvaient réduire *in vitro* les agrégats de polyglutamine en chaperons chimiques qui, à leur tour se lient et stabilisent les protéines mal repliées [76]. Parmi les divers composés testés (plus de 200) le tréhalose était le candidat le plus efficace pour diminuer les agrégats de protéines toxiques dans le cerveau et le foie. Des études *in vivo* sur un modèle murin atteint de la maladie d'Huntington ont mis en évidence une augmentation de la durée de vie ainsi qu'une amélioration des symptômes moteurs après administration orale de tréhalose (2% massique de tréhalose dans de l'eau potable).

2.2- Tréhalose contre la maladie d'Alzheimer

En 2005, Liu *et al.* ont étudié une nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement de la maladie d'Alzheimer [85]. Afin d'étudier les propriétés du tréhalose et plus particulièrement sa capacité à dissoudre les agrégats des peptides β -amyloïde, le tréhalose a été incubé avec deux formes prédominantes du peptide β -amyloïde A β ₄₀ et A β ₄₂. L'action du tréhalose a été contrôlée

par fluorescence à différentes concentrations (0,1 à 50 mM en tréhalose). Cette étude a révélé que le tréhalose inhibait l'agrégation avec un effet dose-dépendant. En effet, une concentration de 50 mM menait à une inhibition complète de l'agrégation et de la formation de fibrilles et d'oligomères d'A β ₄₀ et dans une moindre mesure d'A β ₄₂. La diminution du nombre de fibrilles et d'oligomères lors de l'ajout de tréhalose a par ailleurs été qualitativement confirmée en imagerie AFM (microscopie à force atomique). La co-incubation de tréhalose et de cellules humaines de type SH-SY5Y en présence d'agrégats A β ₄₀ et A β ₄₂ a permis de réduire de manière significative la cytotoxicité induite par les agrégats des peptides β -amyloïde A β ₄₀. Pour la forme A β ₄₂, aucune différence notable n'a été observée. L'effet plus important du tréhalose sur l'agrégation de la forme A β ₄₀ peut s'expliquer par la différence de polarité entre ces deux formes. En effet, A β ₄₂ est plus hydrophobe et s'agrège plus facilement que la forme A β ₄₀ ce qui est notamment dû à un gain d'entropie.

2.3- Tréhalose contre la maladie de Parkinson

Suite à ces études, l'équipe de David Rubinsztein a pu reproduire les résultats obtenus précédemment et adapter les expériences dans le cas de la maladie de Parkinson [86]. L'évaluation de la clairance des formes mutantes de l' α -synucléine (A53T et A30P) dans des cellules PC12 chez le rat a montré que le tréhalose améliorait significativement leur élimination. La capacité du tréhalose à induire l'autophagie a ensuite été confirmée par mesure du taux de protéines LC3-II sur différentes lignées cellulaires modèles de la maladie de Parkinson (l'accumulation de LC3-II étant caractéristique d'une augmentation de la formation d'autophagosomes). Après avoir découvert que le tréhalose possédait la capacité de réduire les agrégats d' α -synucléine, le mécanisme d'action a été étudié. Ainsi, comme vu précédemment dans le Chapitre II partie 1, le tréhalose agit également comme activateur d'autophagie indépendant de mTOR *via* l'inhibition des transporteurs de glucose (SLC2A) dans la membrane plasmique, induisant un déficit en glucose et donc l'activation de l'autophagie dépendante de l'AMPK (*activated protein kinase*, une enzyme intervenant dans le métabolisme énergétique). Ces travaux ont ouvert la voie à de nouvelles stratégies pour le traitement de la maladie de Parkinson. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la présence de tréhalose en faible concentration (1 à 10 mM) pouvait également désagréger les fibrilles d' α -synucléine A53T en petit agrégats. [87,88].

Globalement, ces dix dernières années ont mis en lumière les propriétés biologiques intéressantes du tréhalose, *in vitro* (sur des neuroblastomes, fibroblastes, etc...) et *in vivo* (sur des macaques, rats, souris, ...), pour lutter contre les maladies neurodégénératives. Depuis, le développement de nouveaux systèmes capables de traverser la BHE pour la délivrance de tréhalose au sein du SNC fait l'objet d'un intérêt croissant. Quelques nanosystèmes composés de tréhalose ont vu le jour (nanoparticules de carbones, or, fer, polymères, ...) et ont montré une meilleure activité du tréhalose par rapport à sa forme libre (notamment grâce à sa protection contre la dégradation en milieu biologique) et à un ciblage des sites actifs. [89–91].

Tableau 2. Quelques exemples des effets neuroprotecteurs du tréhalose *in vitro*

Lignée cellulaire	Concentrations en tréhalose	Résultats	Référence
Maladie d'Huntington			
Fibroblaste humain	100 mM	Augmentation du nombre de cellules prolifératives de la peau Réduction de la quantité d'huntingtine et de l'accumulation de protéines poly-ubiquitines dans les fibroblastes modèle de la maladie Augmentation de l'autophagie médiée par des molécules chaperonnes	[92]
Cellule PC12	100 mM	Augmentation de l'autophagie Réduction de la quantité d'huntingtine	[93]
Maladie d'Alzheimer			
Cellule SH-SY5Y	0,5, 2 et 4 μ M	Inhibition de la formation de fibres amyloïdes. Retardement de la croissance amyloïde ThT-positif	[94]
Cellule SH-SY5Y	100 mM	Augmentation de l'autophagie à court terme (4h) Diminution de la sécrétion d'A β non médiée par l'autophagie	[95]
Maladie de Parkinson			
Cellule PC12	10, 50, et 100 mM	Régulation et augmentation de la macroautophagie. Réduction de la quantité d' α -synucléine A53T	[96]
Neuroblastome humain NB69	50 et 100 mM	Augmentation du nombre d'autophagosomes et du flux autophagique Prévention de la nécrose des cellules	[97]

Tableau 3. Quelques exemples des effets neuroprotecteurs du tréhalose *in vivo*

Modèle animal	Voie d'administration	Concentrations en tréhalose	Résultats	Référence
Maladie d'Huntington				
Souris transgénique R6/2	Voie orale (Eau)	2% (m/v)	Diminution des agrégats de polyglutamine (cerveau et foie) Amélioration des fonctions motrices et prolongation de la durée de vie des modèles de souris de la maladie	[76]
Maladie d'Alzheimer				
Souris transgénique P301S	Voie orale (Eau)	2% (m/v)	Activation de l'autophagie Réduction de la quantité d'agrégats tau et amélioration de la survie des cellules nerveuses	[98]
Souris transgéniques Tg2576	Voie orale (Eau)	2% (m/v)	Amélioration des performances cognitives	[99]
Maladie de Parkinson				
Rat et macaques cynomolgus AAV1/2-hA53T-aSyn	Voie orale (Eau)	2.67 g.kg ⁻¹	L'effet du tréhalose sur la dopamine striatale peut produire une restauration comportementale significative Augmentation du taux de dopamine dans le putamen et des transporteurs à dopamine chez les macaques	[100]
Rat AAV1/2-hA53T-aSyn	Voie orale (Eau)	5,2 et 0,5%	Activation de l'autophagie Réduction des déficits moteurs induits par l' α -synucléine et de l'agrégation de l' α -synucléine	[101]

Chapitre III : Transport d'agents thérapeutiques vers le système nerveux central

1- La Barrière Hémato-Encéphalique

1.1- Structure et fonction

Caractérisée en 1885, la BHE est une barrière physiologique qui sépare les vaisseaux sanguins du tissu cérébral [102,103]. Elle permet de filtrer et de contrôler le passage des substances sanguines étrangères, des molécules potentiellement dangereuses ou encore des agents pathogènes et les empêche de passer librement du sang vers le liquide extracellulaire de la substance grise du cerveau. De plus, elle protège les cellules cérébrales par la régulation du milieu environnant (homéostasie vasculaire cérébrale) permettant de lutter contre des variations de concentration en hormones et neurotransmetteurs, et contre les modifications de l'acidité du sang. La BHE est donc hautement résistante au mouvement des ions et permet de maintenir l'équilibre chimique du cerveau et d'ajuster le milieu ionique afin de garantir une transmission parfaite des signaux entre neurones (**Figure 11**).

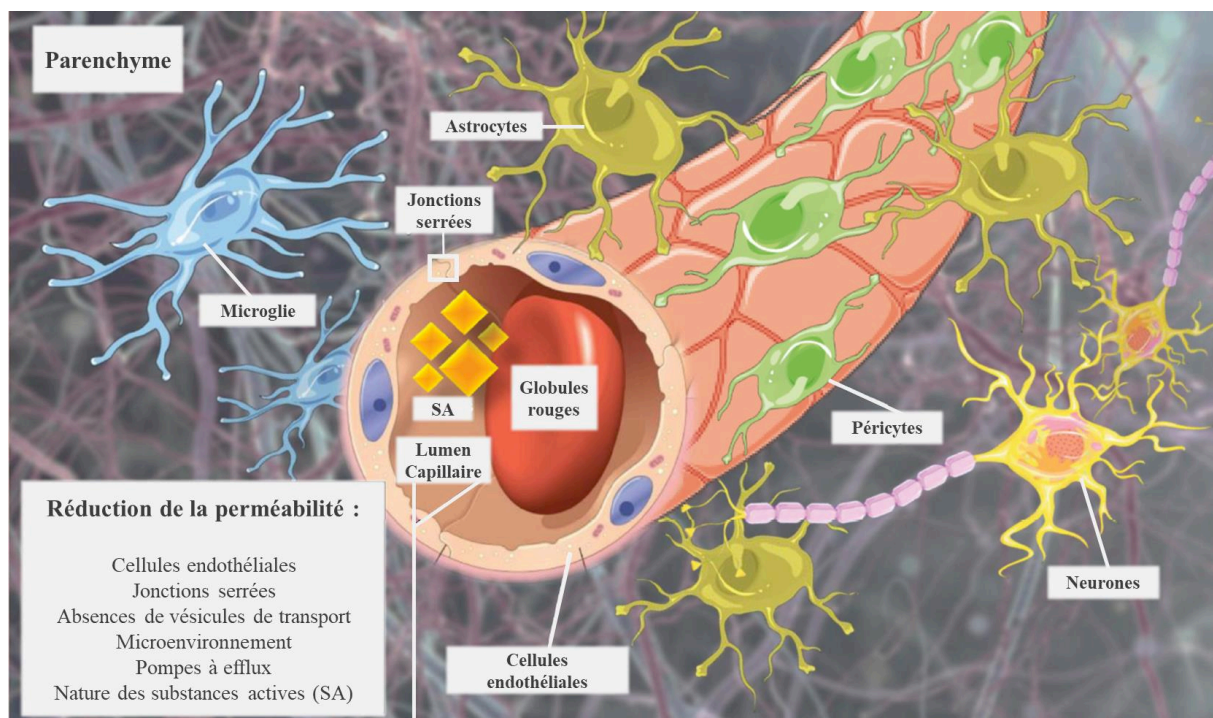


Figure 11. Structure de la Barrière Hémato-Encéphalique. Plusieurs éléments constitutifs de la BHE réduisent la perméabilité et contrôlent le passage de molécules. Adapté de Cano et al. [104].

Dans le cas de traitements non invasifs des troubles neurologiques, le passage des médicaments à travers la BHE est nécessaire. Or, les cellules constituant cette barrière possèdent des « jonctions serrées » constituées de protéines transmembranaires (claudines, occludine et JAM) permettant de contrôler les propriétés de perméabilité paracellulaire de la BHE en régulant le passage de la plupart des molécules et le transport d'ions.

La BHE est essentiellement composée de cellules endothéliales spécialisées qui tapissent la microvascularisation, entourées par une couche protéique (lame basale), qui constitue une barrière supplémentaire contre le passage des molécules vers le cerveau. Cette double couche épaisse se compose de collagène de type IV, de protéoglycanes de sulfate d'héparine, de laminine, de nidogène, de fibronectine et autres protéines de la matrice extracellulaire. La BHE possède également deux autres types de cellules, les astrocytes et les péricytes (**Figure 11**).

Représentant la plus grande population de cellules gliales (qui participent au contrôle de l'environnement chimique et électrique), les astrocytes se présentent sous la forme de cellules étoilées aux multiples prolongements cytoplasmiques, permettant d'interagir avec les cellules endothéliales. Ils apportent également un lien cellulaire entre les circuits neuronaux et les vaisseaux sanguins. Ces cellules possèdent différentes fonctions importantes parmi lesquelles l'alimentation des neurones, les phénomènes de cicatrisation des lésions du système nerveux ou leur intervention lors de la gliose (prolifération des cellules). Les astrocytes sont également l'une des plus grandes sources de production de cholestérol au sein du cerveau.

Les péricytes sont quant à elles des cellules mésenchymateuses indifférenciées, qui s'enroulent autour des cellules endothéliales. Elles sont importantes pour le maintien de l'intégrité de la BHE, la régulation de l'entrée des cellules immunitaires dans le SNC, la myogenèse (formation des vaisseaux sanguins) et le contrôle du flux sanguin cérébral. En effet, elles possèdent des propriétés de contraction, de régulation de l'endothélium et des propriétés macrophagiques (ingestion et destruction de grosses particules). Ces propriétés de contraction sont notamment dues à leur forte concentration en actine ce qui leur permet ainsi de réguler la pression sanguine. Ces cellules sont également liées aux cellules endothéliales par le biais de jonctions communicantes (permettant l'échange d'ions et de petites molécules entre les cellules endothéliales et les péricytes), de plaques d'adhésions focales et d'invaginations, qui assurent un fort ancrage mécanique des péricytes à l'endothélium.

En conclusion, tous ces éléments jouent un rôle important dans la formation et le maintien de l'intégrité de la BHE en régulant la prolifération, la migration et la ramification vasculaire des cellules endothéliales cérébrales [105,106]. Comme présenté, la diffusion de molécules à travers la BHE est contrôlée par la présence de jonctions serrées ne laissant passer que très peu d'éléments. Une conséquence directe de cette architecture est donc la difficulté clinique d'administration de composés thérapeutiques au cerveau. Le passage de la BHE constitue ainsi le plus grand défi à relever dans le cadre d'un traitement thérapeutique lorsqu'il s'agit de cibler directement les cellules cérébrales.

1.2- Mécanisme de transport à travers la barrière hémato-encéphalique

Les transports membranaires constituent une activité primordiale de la cellule en permettant l'échange d'ions ou de molécules entre les milieux intra- et extracellulaires (**Box 2**). Dans le cas particulier de la BHE, le transport paracellulaire, la diffusion passive transcellulaire, le transport médié par des protéines, et la transcytose médiée par des récepteurs sont présents (**Figure 12**) [107].

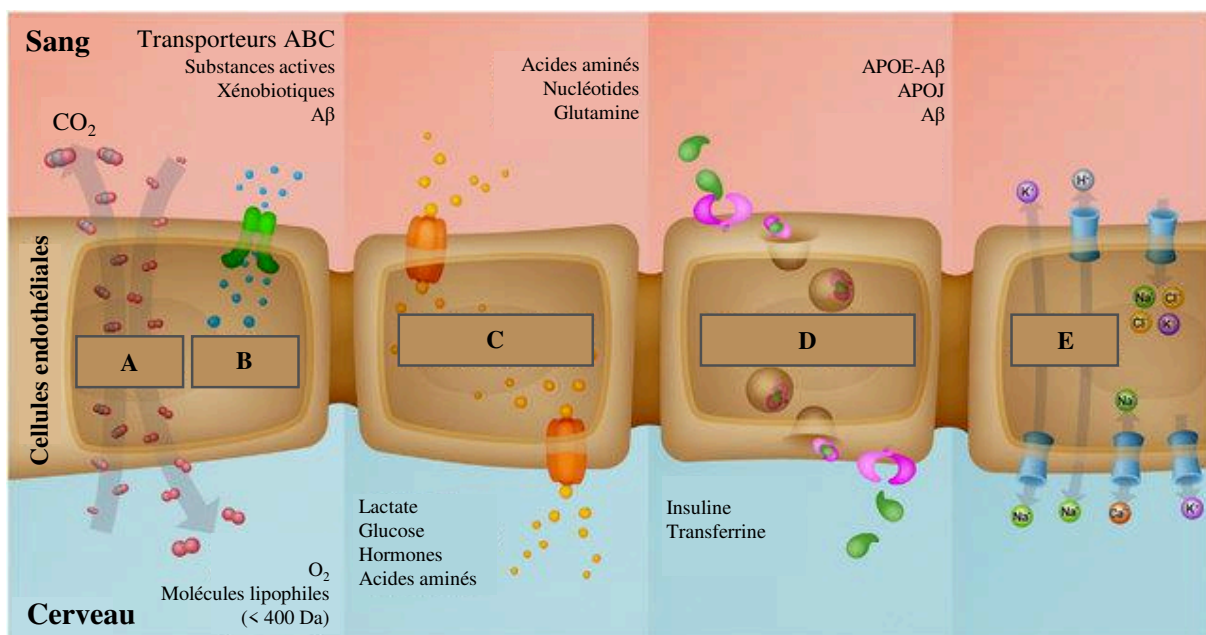


Figure 12. Mécanismes de transport à travers la barrière hémato-encéphalique. Diffusion passive (A), transport par efflux via l'utilisation des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) (B), les transports par SLC (C), la transcytose médiée par les récepteurs (RMT) (D) et le transport d'ions (E). Adapté de Pandit et al. [108].

La diffusion passive transcellulaire (passage à travers la cellule) est généralement dédiée aux molécules possédant un fort caractère hydrophobe et un faible poids moléculaire (<400-500 Da). Ce sont telles que les barbituriques, la caféine, les gaz (O₂, CO₂), qui peuvent diffuser passivement à travers les membranes cellulaires luminales et adluminales dans la direction du gradient de concentration. La diffusion passive paracellulaire (passage entre les cellules) est généralement empêchée dans le cas de la BHE par la présence des jonctions serrées évoquées précédemment.

La diffusion active primaire ou directe par efflux mobilise un ensemble de transporteurs dont 48 sont des transporteurs de cassette liant l'ATP (ou ABC pour ATP Binding Cassette), comme la glycoprotéine P (Pgp:ABCB1) et la protéine liée au cancer du sein (BCRP:ABCG2). Ce sont les principaux transporteurs ABC, permettant le passage de diverses substances telles que des ions, des stérols, des nucléosides ou encore des macromolécules. Par ailleurs, les transporteurs ABC puisent leur énergie dans l'hydrolyse de l'ATP.

Le groupe des transporteurs de solutés (SLC pour *solute carrier*) regroupe plus de 430 éléments comprenant à la fois des molécules organiques chargées et non chargées ainsi que des ions inorganiques et le gaz ammoniac. Les transporteurs d'oligopeptides protons dépendant, d'anions organiques, de cations organiques, de nucléosides, de mono-amines, de monocarboxylates font partis de la famille des SLC. Contrairement à leurs homologues transporteurs ABC, le transport de solutés ne nécessite pas d'ATP, le passage étant dirigé par un gradient de concentration établi par le soluté transporté ou par un gradient électrochimique (Na⁺ ou H⁺).

Des peptides sélectifs et des protéines de haut poids moléculaire peuvent également pénétrer dans le cerveau par endocytose en se liant à des récepteurs sur les cellules endothéliales. Ce phénomène est appelé transcytose médiée par les récepteurs (RMT pour *Receptor-mediated transcytosis*) et fait appel à l'utilisation des récepteurs à insuline, de la transferrine ou des lipoprotéines de basse densité (LDL *Low Density Lipoprotein*).

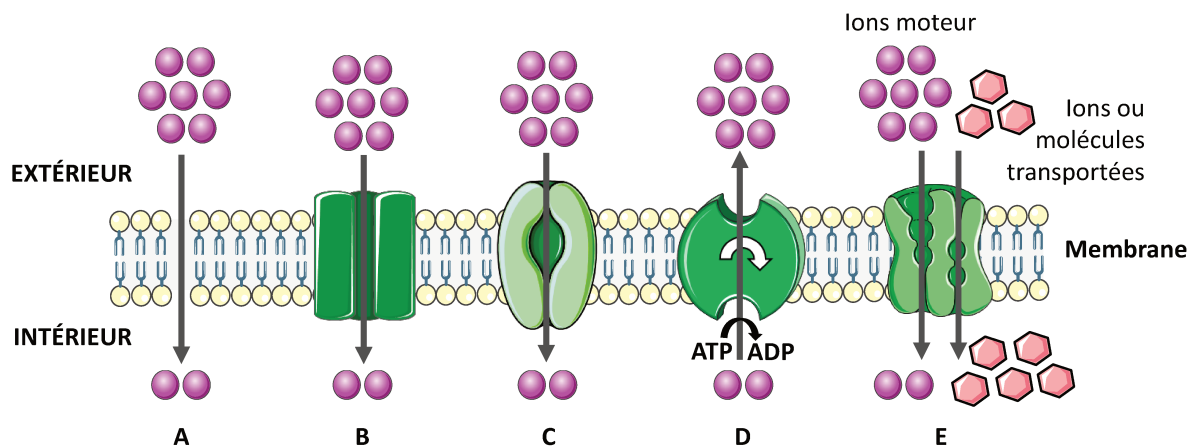
BOX 2 : Les transports membranaires

Deux types de transports sont possible :

- La perméabilité de la membrane (et sans déformation de celle-ci) c'est le transport perméatif
- L'échange avec déformation de la membrane qui utilise une vésicule, c'est le transport cytotique.

Le transport perméatif : transport transmembranaire n'impliquant pas de modification morphologique de la membrane plasmique.

Il faut distinguer le *transport passif* qui ne consomme pas d'énergie car s'effectue dans le sens du gradient de concentration, et le *transport actif* qui consomme de l'énergie fournie soit par hydrolyse de l'ATP soit par la dissipation d'un gradient ionique.



Les différents types de transport membranaires

Le transport passif :

- Diffusion simple directement à travers la membrane (A)
Petites molécules apolaires ou les gaz
- Diffusion facilitée par l'intermédiaire de protéines membranaires (transporteurs) : **perméases** et **canaux ioniques**
Les perméases se lient spécifiquement au substrat (sucres, acides aminés, nucléosides, ...), puis subissent un changement de conformation permettant à la molécule de traverser la membrane avant libération du côté opposé (B)
Les canaux ioniques chimio-dépendants s'ouvrent sous l'action d'un ligand, les canaux voltage-dépendant sous l'action d'une modification du potentiel de la membrane, les canaux mécanorécepteurs sous l'action d'un déplacement mécanique (C)

Le transport actif :

- Transport actif primaire, au moyen de **pompes** (ATPases) (D)
Pour les ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ ou certaines grosses molécules mais contre le gradient de concentration d'où la consommation énergétique (provenant de l'hydrolyse de l'ATP).
- Transport actif secondaire (**co-transport**) où une substance et un ion en interaction avec le même transporteur sont transférées à travers la membrane dans le même sens (**symport**) (E) ou en sens opposé (**antiport**) (l'ATP n'est pas utilisée).

Le transport cytotique :

Les substances transportées (volumineuses) sont enfermées transitoirement dans des vésicules.

- L'**endocytose** : pinocytose sans récepteur et avec récepteur (plus spécifique), et phagocytose (endocytose de particules volumineuses comme les bactéries, les débris cellulaires, ... Les vacuoles de phagocytose sont des phagosomes)
- L'**exocytose** (excrétion de produits qui peut être constitutive (continue), ou régulée (contrôlée))

La BHE maintient donc l'homéostasie cérébrale essentielle, mais en conséquence, représente un obstacle important au traitement efficace de nombreuses maladies cérébrales. Pour une délivrance directe de substances actives au cerveau, les molécules peuvent être administrées par des stratégies locales comme avec l'utilisation de mini-pompes pour une livraison intracrânienne, ou encore des injections intra-cérébroventriculaires ou intraparenchymateuses. Cependant, il s'agit de techniques d'interventions chirurgicales invasives et risquées. C'est pourquoi, de nombreux efforts ont été réalisés pour concevoir des formulations thérapeutiques non invasives pour une distribution optimale à travers la BHE [109].

Parmi l'ensemble des voies d'administrations existantes, les voies entérales (orale), parentérales (injection) et intranasales représentent des alternatives prometteuses. Les deux premières permettent le passage de la BHE par divers mécanismes (diffusion simple, récepteur, endocytose par adsorption ou passage par transporteur), selon la fonctionnalisation des formulations thérapeutiques utilisées. Néanmoins, la voie entérale implique un premier passage hépatique diminuant la concentration en substances actives dans la circulation. La voie nasale, menant à une absorption intra-neuronale, représente une approche intéressante. L'absorption des substances actives du nez vers le cerveau s'effectue par l'intermédiaire des nerfs olfactifs et trijumeaux présents dans l'ensemble de la cavité nasale, entre l'épithélium olfactif et le cerveau. Ainsi, la voie nasale permet un passage rapide et important de ces molécules dans la circulation systémique sans métabolisation hépatique, évitant ainsi leur dégradation. Par conséquent, les doses instillées par voie nasale sont généralement 2 à 10 fois inférieures aux doses ingérées par voie orale. Cependant, l'utilisation de cette voie comporte certaines limitations. En effet, l'architecture de la cavité nasale peut limiter le volume d'instillation et le mucus sécrété par l'épithélium olfactif peut conduire à des dégradations enzymatiques des substances (présence d'enzymes de métabolisation). Malgré ces limites, le transport direct de substances thérapeutiques vers le cerveau par voie nasale semble plus prometteur que les voies d'administration plus conventionnelles telles que la voie orale ou intraveineuse.

Le développement de systèmes synthétiques jouant le rôle de cargos qui permettrait le passage de la BHE par l'une de ces voies d'administration pour délivrer efficacement des substances actives thérapeutiques dans le cerveau constitue l'un des grands défis de la chimie pharmaceutique. Parmi l'ensemble des systèmes existants, les nano-objets sont particulièrement intéressants puisque leur taille nanométrique leur permet notamment de traverser les membranes biologiques par différents mécanismes de reconnaissance et de transport cellulaires.

2- Les nanotechnologies au service du passage de la BHE

Ces dernières années, de nombreuses approches ont été développées dans le but d'améliorer l'administration et la biodistribution de substances actives pour le traitement des maladies neurodégénératives.

Parmi elles, les nanotechnologies offrent la possibilité d'élaborer des nanovecteurs thérapeutiques, grâce à leur biocompatibilité et leur capacité à cibler les sites pathologiques, à traverser les membranes biologiques telles que la BHE, ou encore à encapsuler des substances actives hydrophiles et hydrophobes [110]. Les nanosciences représentent le domaine multidisciplinaire lié à la conception, la fabrication et l'étude des systèmes à l'échelle du nanomètre. L'un des défis majeurs de la délivrance de substances actives au sein du cerveau repose sur le choix d'un vecteur adapté aux différents paramètres tels que la nature de la substance active (hydrophile, hydrophobe ou amphiphile), la cible pathologique, ou encore la cinétique de libération [111]. Les nanotechnologies les plus répandues dans la littérature font appels aux nanoémulsions, nanogels, liposomes, dendrimères (polyamidoamine, poly(propylène imine)), micelles, nanoparticules polymères (acide poly(lactique-co-glycolique), poly(éthylène imine), chitosan, ...), nanoparticules inorganique (or, silice) et nanotubes de carbone. Globalement, ces nanotechnologies permettent la protection et la libération de substances actives, et peuvent être utilisées dans le cadre du diagnostic, de la prévention et du traitement.

Dans les sections suivantes, deux types de formulations : qui sont les nanoémulsions et les nanoparticules, seront présentées du fait de leurs multiples avantages pour le développement de nouveaux vecteurs thérapeutiques.

2.1- Les nanoémulsions

S'opposant aux macro- et microémulsions utilisées dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique, les nanoémulsions se différencient par le diamètre des gouttelettes de l'ordre de la dizaine à la centaine de nanomètre, et possèdent une plus grande stabilité colloïdale face aux phénomènes de floculation et de coalescence (**Tableau 4**) [112].

Tableau 4. Les différents types d'émulsions. *Propriétés physico-chimiques, stabilité et méthodes de préparation. Adapté de Gupta et al. [113], et Prévot et al. [114].*

	Macroémulsion	Microémulsion	Nanoémulsion
Taille	2-20 μM	< 0,1 μM	0,1-0,3 μM
Polydispersité	Élevée (>40%)	Faible (<10%)	Faible (<10-20%)
Stabilité cinétique	Stable	Stable	Instable
Stabilité thermodynamique	Instable	Instable	Stable

Les nanoémulsions sont constituées de trois éléments : une phase aqueuse, une phase huileuse et des tensioactifs (ou émulsifiants). La formation de nanoémulsions repose sur la dispersion colloïdale de gouttelettes sphériques (la phase *dispersée*) dans une phase dite *continue* non miscible toutes deux, stabilisées à l'aide de tensioactifs appropriés [115]. En fonction de la nature des phases dispersées et continues, trois types de nanoémulsions peuvent être formées. Les nanoémulsions de gouttelettes d'huile dispersées dans l'eau (H/E, Huile dans Eau) permettent l'encapsulation de substances actives hydrophobes ou amphiphiles (**Figure 13**).

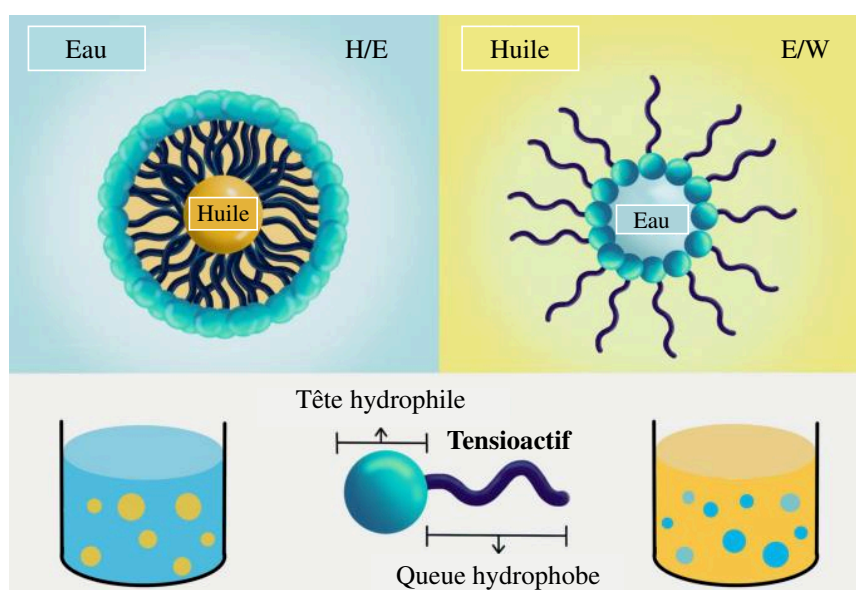


Figure 13. Les deux principaux types de nanoémulsions. *Les nanoémulsions huile dans eau (gauche) et les nanoémulsions eau dans huile (droite). Issu et adapté de Ashaolu et al. [116].*

Les nanoémulsions de gouttelettes d'eau dispersées dans l'huile (E/H) ou huile dans huile (H/H) sont utilisées pour encapsuler et libérer des substances actives hydrophiles ou hydrophobes respectivement. Par ailleurs, de nouvelles techniques de formation de nanoémulsions multiples (H/E/H ou E/H/E) ont également été développées pour simultanément encapsuler des molécules hydrophiles et hydrophobes.

Le choix de la phase huileuse est un élément clé qui influence la biodisponibilité de la substance active [117,118]. Dans le cas de la curcumine par exemple, elle est maximisée dans les nanoémulsions formulées avec des triglycérides à chaînes moyenne et longue. En effet, selon les paramètres de formulation visés (taille des gouttelettes, solubilité des substances actives, stabilité colloïdale des nanosystèmes), différentes huiles végétales et synthétiques peuvent être utilisées. Les huiles végétales comprennent l'huile de soja, de coco ou encore l'huile de carthame et sont majoritairement constituées de triglycérides à chaîne longue. Les huiles synthétiques incluent le Miglyol 812N ou encore le Sefsol 218 et permettent la solubilisation de certaines substances actives qui ne le seraient pas dans des huiles naturelles. Par ailleurs, l'utilisation d'huiles approuvées par la pharmacopée européenne est privilégiée dans le cadre d'applications biomédicales comme l'administration de substances actives par voie intranasale ou parentérale [119].

Rappelons que les tensioactifs sont des molécules amphiphiles qui permettent de réduire la tension interfaciale entre les deux phases, huile et eau, et de stabiliser les gouttelettes formées [120]. De nombreux émulsifiants aux caractéristiques différentes peuvent être utilisés en fonction de la masse molaire (tensioactifs de faible masse molaire ou macromolécules) ou encore de la nature de la tête polaire (anionique, cationique, amphotère ou neutre) [121]. Le choix du tensioactif ou du mélange de tensioactifs influence à la fois la taille des gouttelettes, la toxicité, la stabilité colloïdale des nanoémulsions, ainsi que la pharmacocinétique des substances actives. Les émulsifiants de faible masse molaire sont les plus communément utilisés comme le désoxycholate de sodium, les polyoxyéthylène sorbitan monolaurate (Tween 20, 40, 60, 80), les lécithines et le Solutol[®] HS 15. L'utilisation des tensioactifs macromoléculaires ou polymères (homo-, co- ou biopolymères tels que les polysaccharides, les poloxamères ou les protéines) est moins répandue.

Il existe de nombreuses techniques de formulation des nanoémulsions classées en deux catégories : les méthodes à haute et à basse énergie [122]. Les méthodes à haute énergie sont réalisées sous contrainte mécanique et comprennent la microfluidisation, les ultrasons, et l'homogénéisation à haute pression. Elles permettent de contrôler de manière efficace la

composition, la taille et la stabilité colloïdale des objets formés. Les méthodes à faible énergie incluent quant à elles les méthodes d'émulsification spontanée, de température d'inversion de phase, de composition d'inversion de phase et de point d'inversion d'émulsion. Ces techniques utilisent l'énergie apportée par les différents composants pour former spontanément les nanoémulsions [123].

De façon générale, les nanoémulsions ont l'avantage de pouvoir répondre aux problématiques de solubilité et de dégradation (enzymatique, oxydation, pH, et hydrolyse) des substances actives. De plus, du fait de la plasticité du système, les nanoémulsions peuvent potentiellement traverser plus efficacement la BHE ce qui en fait des nano-objets idéaux pour l'administration de substances actives dans le cadre du traitement de maladies neurodégénératives et plus particulièrement la maladie de Parkinson [124].

Plusieurs études ont par ailleurs validé l'intérêt des nanoémulsions pour l'administration de substances actives par voie intranasale [125,126]. Ainsi, Mustafa *et al.* ont rapporté la formulation de nanoémulsions (H/E) chargées en ropinirole, un agoniste dopaminergique des récepteurs à dopamine D2/D3 qui stimule les récepteurs dopaminergiques du striatum (**Figure 14A**) [127].

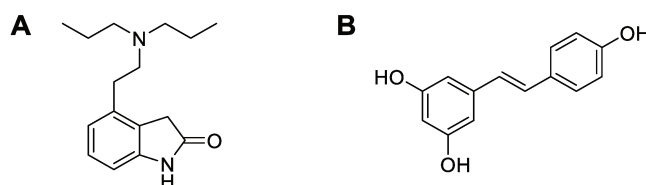


Figure 14. Structures chimiques de substances actives encapsulées à l'intérieur de nanoémulsions. Structure du ropinirole (A) et structure du resvératrol (B).

À l'état libre, le ropinirole possède une faible biodisponibilité après administration par voie orale et une demi-vie relativement courte. Des formulations monodisperses (PdI = 0,201) de globules huileux de diamètre de $58,6 \pm 5,2$ nm encapsulant la substance active ont été préparées. Des études *ex vivo*, *in vitro* et *in vivo*, sur des cerveaux de rats (Wistar) ont montré que l'utilisation de nanoémulsions chargées en ropinirole conduisent à une concentration plus élevée en substance active dans le cerveau après administration intranasale. Ainsi, son encapsulation dans des nano-objets a permis de protéger la substance active et d'améliorer sa délivrance au niveau du site d'intérêt. Pageni *et al.* ont conçu des nanoémulsions (H/E)

chargées en resvératrol, un puissant antioxydant naturel (**Figure 14B**) [128]. À l'instar du ropinirole, la biodisponibilité du resvératrol suite à une administration par voie orale reste faible en raison de sa métabolisation rapide par l'enzyme CYP1B1 du cytochrome P450 en un métabolite connu sous le nom de piceatannol et identifié comme agent antileucémique [129]. Ainsi, les nanoémulsions ont été préparées par une méthode d'émulsification spontanée, suivie d'une homogénéisation à haute pression. Des suspensions monodisperses ($PdI = 0,158 \pm 0,02$) de globules huileux de $102 \pm 1,5$ nm de diamètre ont été caractérisées puis testées *in vivo* (sur des rats Wistar). Des études pharmacocinétiques et histopathologiques ont montré une concentration plus élevée en resvératrol dans le cerveau après administration par voie intranasale ainsi qu'une activité neuroprotectrice (antioxydante) contre la neurodégénérescence. Tous les neurones présentent des noyaux avec des nucléoles proéminents dans le contrôle négatif (rat sain). Dans le groupe témoin positif (rat induit par l'halopéridol), une vacuolisation et un rétrécissement prononcés des noyaux ont été observés avec une dégénérescence importante. Enfin, le traitement avec la nanoémulsion chargée en resvératrol a montré une diminution de la dégénération avec de grands noyaux vésiculaires pour la plupart des neurones.

Ces résultats montrent que ces nanosystèmes sont intéressants pour l'administration de substances actives pour le traitement de la maladie de Parkinson. Pourtant, malgré les nombreux avantages des nanoémulsions tels qu'une grande stabilité colloïdale et une biodisponibilité accrue, leur utilisation est encore limitée car leurs effets sur la santé sont encore en cours d'évaluation. Ainsi, l'utilisation de certains excipients pour leur préparation peut ne pas convenir à ce type d'utilisation en raison de leur potentielle toxicité. Enfin, de grandes quantités de tensioactifs ou de solvants organiques sont utilisées pour former des nanoémulsions, et sont également potentiellement toxiques.

2.2- Les nanoparticules

Les nanoparticules (NPs) sont l'un des systèmes les plus utilisés pour l'administration de substances actives vers le cerveau. En effet, les NPs offrent de nombreux avantages par rapport à l'administration de substances actives libres en autorisant le ciblage, la protection ainsi que la libération prolongée (ou contrôlée) des substances [130]. La très grande diversité des NPs se partage en deux groupes : inorganiques et organiques [131]. Les NPs inorganiques ont été largement étudiées en tant qu'agents thérapeutiques notamment pour les traitements de

nombreuses maladies en raison de leurs propriétés physico-chimiques uniques, la facilité de fonctionnalisation de surface et leur biocompatibilité [132,133]. Ces dernières années, une grande variété de NPs inorganiques a été développée incluant les NPs d'or, les NPs magnétiques, les NPs de conversion ascendante et les NPs de silice mésoporeuse. Néanmoins, l'utilisation de NPs inorganiques dans le cadre d'applications biomédicales reste soumise à controverse, notamment en ce qui concerne leur clairance et leur toxicité *in vivo*. Bien que ces dernières années ont été marquées par le développement de NPs inorganiques biodégradables, trop peu d'études se sont intéressées aux mécanismes de dégradation ainsi qu'à la toxicité des fragments formés [134].

À l'inverse, de leurs homologues inorganiques les NPs organiques sont généralement composées de lipides, de sucres, ou de polymères [135]. Ainsi les NPs solides lipidiques (SLNs) ou les NPs polymères présentent l'avantage d'utiliser des matériaux biocompatibles et biodégradables, listés comme GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pour certains. Elles permettent ainsi de s'affranchir d'une potentielle toxicité liée aux métabolites formées. La suite de cette section se concentrera plus particulièrement sur les NPs polymères formés à partir de PLGA (Poly(acide lactique-co-glycolique)) et les SLNs. Ces nanosystèmes ont déjà montré par le passé leur capacité à délivrer des substances actives au sein du cerveau, notamment pour le traitement des maladies neurodégénératives.

Les nanoparticules de PLGA

Le PLGA est le polymère le plus couramment étudié et utilisé pour le développement de nanosystèmes à libération contrôlée. Biocompatible, non toxique et biodégradable, il a été approuvé par la FDA et l'Agence européenne des médicaments (EMA). Les NPs de PLGA en tant que système de délivrance améliorent la solubilité des substances actives hydrophobes encapsulées, confèrent une protection contre la digestion enzymatique, ainsi qu'une efficacité de ciblage et une meilleure internalisation cellulaire. Les dernières avancées en matière de NPs de PLGA en tant que cargos de substances actives pour le traitement des maladies neurodégénératives ont données lieu à une revue publiée dans le journal *Pharmaceutics* et présentée en annexe.

En résumé, les NPs de PLGA sont biocompatibles et biodégradables et possèdent une grande stabilité colloïdale ainsi qu'une fonctionnalisation de surface facilitée permettant d'améliorer le ciblage des particules et donc la distribution des substances actives. De plus, de

nombreuses études ont montré le potentiel des NPs de PLGA pour le traitement des maladies neurodégénératives et plus précisément la maladie de Parkinson. Ainsi, notre équipe de l'Institut des Maladies Neurodégénératives a déjà pu montrer la capacité qu'ont des NPs de PLGA à restaurer la fonction lysosomale déficiente par la réacidification du milieu dans le cadre du développement d'une nouvelle voie de traitement [136].

À l'instar des NPs de PLGA, d'autres systèmes composés essentiellement de lipides tels que les SLNs ont également prouvé leur efficacité en tant que cargos pour la délivrance de substances actives vers le cerveau [137].

Les nanoparticules solides lipidiques

Apparu pour la première fois dans les années 1990, le terme nanoparticules solides lipidiques ou SLNs désigne des objets solides de tailles nanométriques à base de lipides non toxiques et biodégradables [138]. Ils présentent de nombreux avantages, comparables à ceux des NPs polymères. Les SLNs se sont notamment fait connaître fin 2020 comme systèmes de délivrance d'ARN messager dans les formulations de vaccins contre la COVID-19 commercialisés par Moderna et Pfizer-BioNTech [139]. Parmi ces avantages, la possibilité de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques, l'amélioration de la stabilité des substances actives par rapport à leur forme libre en solution ou encore une libération contrôlée de molécules hydrophobes et hydrophiles variées, telles que de petites molécules ou biomacromolécules de type polysaccharides, ADN, ou encore siARN [140]. Les SLNs comme les NPs polymères, constituent donc des vecteurs particulièrement intéressants dans le cadre de ce projet.

Les SLNs peuvent être obtenues à partir de nombreuses techniques de formulation faisant appel aux lipides, aux tensioactifs, et à une faible quantité de solvant et d'eau. Elles peuvent être formées sous contrainte afin de fournir l'énergie nécessaire pour former les SLNs. Parmi ces méthodes, la formulation par homogénéisation à grande vitesse, sous ultrasons, à différentes températures, avec évaporation de solvant ou encore la microémulsion sont les plus communément utilisées. La variété des méthodes de formation des SLNs permet une meilleure adaptation aux différentes conditions telles que la nature des substances actives encapsulées, le contrôle de la taille, de la polydispersité ou encore de la charge en surface. En effet, de même que pour les NPs de PLGA, la charge surfacique des SLNs est cruciale pour assurer la stabilité colloïdale des suspensions. Pour rappel, une répulsion électrostatique de ± 30 mV est nécessaire

pour assurer la stabilité colloïdale des objets formés [141]. Afin de respecter ces paramètres, la co-formulation des SLNs avec des molécules chargées telles que des lipides ioniques est possible.

A l'instar des nanoémulsions et des NPs polymères, l'utilisation des SLNs en tant que cargos pour l'administration de substances actives dans le traitement des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, a été largement étudiée [142–144]. Esposito *et al.* ont décrit la formation de SLNs pour l'administration de bromocriptine, un puissant agoniste de la dopamine [145]. Elles ont été préparées à partir de différents mélanges et concentrations de lipides (des lipides solides tels que la tristéarine, la monostéarine, la tribénine et une huile liquide de tricaprine par agitation, suivie d'une étape d'homogénéisation ou d'ultrasonication. Des suspensions polydisperses ($PdI > 0,2$) de tailles comprises entre 190 et 300 nm ont été observées et visualisées par cryo-microscopie électronique à transmission (**Figure 15**).

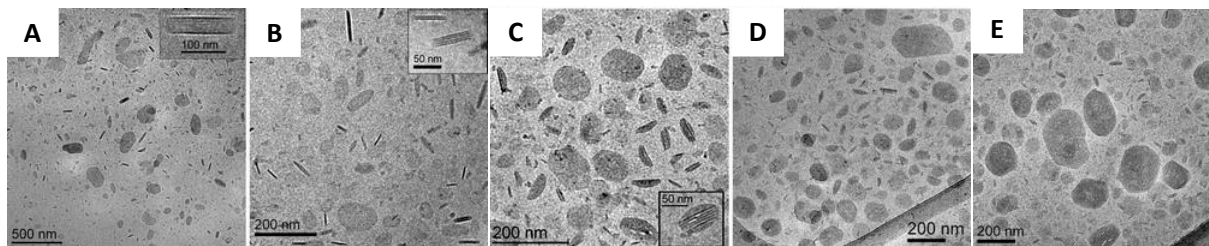


Figure 15. Images de cryo-microscopie électronique à transmission de suspensions de SLNs. SLNs constituées de tristéarine (A), de tristéarine–monostéarine (2:1) (B), de tristéarine–tricaprine (2:1) (C), de tribéhénine (D) et tristéarine–tricaprine (2:1) contenant de la bromocriptine (E). Adapté de Esposito *et al* [145].

Les auteurs ont montré que la formulation de SLNs à base de tristéarine–tricaprine (2:1) possède une efficacité d'encapsulation de la bromocriptine supérieure (84 %) par rapport aux autres types de formulations (environ 75%). Les essais de cinétique de libération ont globalement montré que tous les types de formulations de SLNs bénéficiaient d'une stabilité à long terme et permettaient une libération prolongée de la bromocriptine. Néanmoins la formulation à base de tristéarine–tricaprine (2:1) se démarque encore une fois en exprimant la libération la plus lente de la substance active, libérant jusqu'à 74% du contenu des nano-objets après 48h. Des tests comportementaux sur des rats (6-OHDA) ont permis de mettre en évidence que l'encapsulation de bromocriptine n'augmentait pas son efficacité par rapport à la forme

libre en solution mais diminuait son délai d'action et augmentait sa durée d'action au sein du cerveau, probablement en raison d'une stabilité métabolique ou d'une pénétration cérébrale accrues.

Un autre exemple de l'utilisation des SLNs dans le traitement de la maladie de Parkinson est l'encapsulation d'apomorphine, un agoniste des récepteurs de la dopamine [137]. Tsai et collaborateurs ont formulé des SLNs à partir de tripalmitine, utilisé comme lipide solide, et de monostéarate de glycéryle et monostéarate de polyéthylène glycol (PEG), comme émulsifiants. Les SLNs obtenus ont une taille de 155 nm, et un indice de polydispersité de 0,33. L'encapsulation d'apomorphine dans les formulations a permis d'augmenter d'un facteur supérieur à 10 sa biodisponibilité orale comparativement à la molécule libre en solution. De plus, les tests *in vivo* ont indiqué une meilleure distribution de la substance active vers le striatum après administration par voie entérale. Des études comportementales dans un modèle de rat de la maladie de Parkinson (modèle 6-OHDA) reflétant à la fois la perte dopaminergique nigrostriatale et l'augmentation du stress oxydatif ont mis en évidence une meilleure bioactivité de l'apomorphine dans le traitement des troubles moteurs (rotation des membres) en réduisant la perte des neurones dopaminergiques.

En conclusion, les SLNs sont des nano-objets combinant les avantages des systèmes lipidiques et polymères. Ils sont biocompatibles, possèdent une grande stabilité colloïdale et peuvent encapsuler des substances actives hydrophiles et lipophiles. De même, la fonctionnalisation de surface des SLNs par du poly(éthylène glycol) ou du polysorbate 80 augmente la furtivité en empêchant l'opsonisation ce qui améliore la distribution et la demi-vie des SLNs dans le cerveau [146]. En effet, la fonctionnalisation par le PEG est connue pour limiter l'adsorption des opsonines (des protéines solubles du sang qui se fixent sur les bactéries et en facilitent la phagocytose par les globules blancs) : les SLNs ne sont donc pas considérés comme des corps étrangers et la phagocytose est évitée. Parmi l'ensemble des molécules lipidiques ou amphiphiles susceptibles d'être utilisées pour former des SLNs, les nucléolipides représentent une famille de molécules intéressante car elles possèdent des propriétés uniques d'auto-assemblage et de reconnaissance moléculaire grâce à la présence des nucléobases. Elles ont, par le passé, montré qu'elles pouvaient passer les membranes cellulaires au moyen de transporteurs spécifiques (transporteur de nucléosides) [147]. De plus, leur fonctionnalisation par des chaînes lipidiques leur permet d'être absorbées par diffusion passive [148,149].

3- Délivrance du tréhalose au sein du système nerveux central

Une recherche bibliographique nous apprend que parmi les NPs, celles qui sont fonctionnalisées par des sucres sont 10^2 à 10^5 fois plus efficaces que les sucres seuls [150]. Ce résultat intéressant peut s'expliquer par une stabilité chimique plus importante ou encore par une meilleure absorption cellulaire par endocytose [150,151]. Pourtant seules quelques études, décrites ci-après, se sont intéressées à la délivrance du tréhalose qui nous intéresse ici au sein de neurones d'intérêt pour le traitement des maladies neurodégénératives et dans la maladie de Parkinson en particulier.

Ainsi, Debnath *et al.* ont développé des NPs inorganiques zwitterioniques biocompatibles comme système de délivrance du tréhalose capable de franchir la BHE et d'offrir une absorption cellulaire élevée par endocytose afin de cibler et dégrader les fibrilles et plaques protéiques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (**Figure 16**) [89].

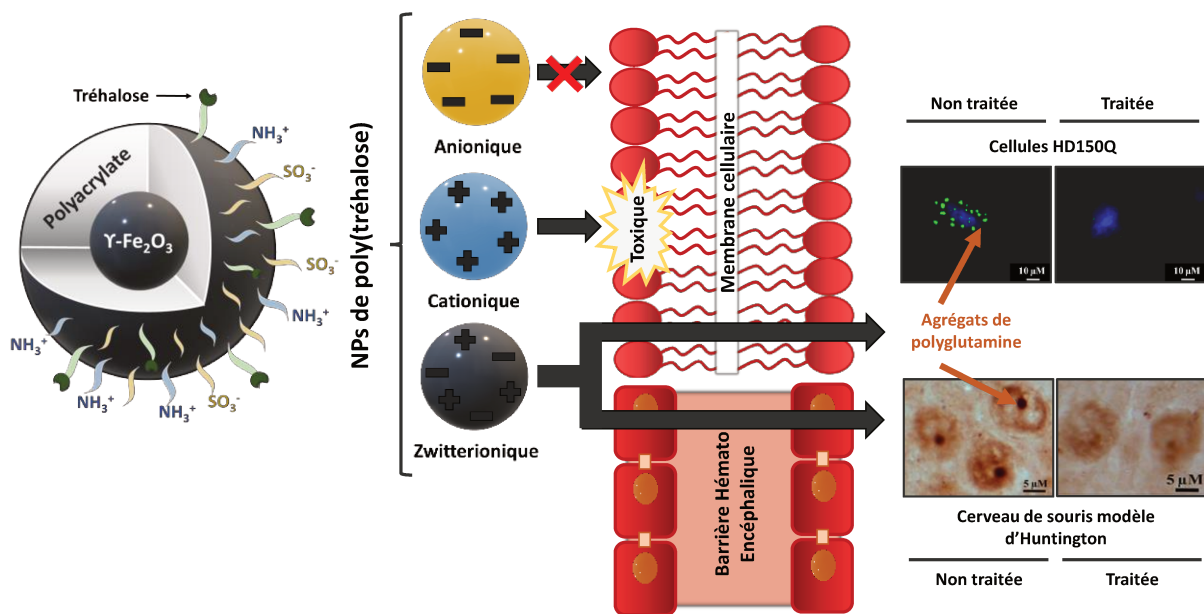


Figure 16. Développement de nanoparticules de poly(tréhalose). Les NPs de poly(tréhalose) diminuent de manière significative les agrégats de polyglutamine *in vitro* et *in vivo*. Adapté de Debnath [89].

Ces NPs composées d'un noyau d'oxyde de fer hydrophobe et d'une couronne hydrophile de polyacrylate sont conjuguées en surface de façon covalente avec du tréhalose. Les NPs obtenues ont une taille comprise entre 20 et 30 nm et sont constituées de 0,5 à 12% massique en tréhalose. Les nano-objets de concentrations compris entre 5 et 12% en tréhalose ont démontré une meilleure efficacité d'inhibition de la formation des fibrilles de peptide A β ₄₀.

Ils ont également permis d'inhiber l'agrégation de la protéine huntingtine. Ces essais ont été réalisés sur des neuroblastomes de souris modèles de la maladie d'Huntington (lignée cellulaire HD150Q). Le couplage des NPs de tréhalose avec de la rhodamine B (sonde fluorescente) a montré une diminution en taille et en nombre des agrégats d'huntingtine. Par ailleurs, ces NPs inhibaient l'agrégation à une concentration très faible en tréhalose (5 μM) alors que le tréhalose libre restait inefficace pour une concentration de 5 mM. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* sur des souris transgéniques modèles de la maladie d'Huntington. Ainsi, ces travaux de recherches ont mis en évidence l'intérêt et l'efficacité des NPs inorganiques fonctionnalisées en surface par du tréhalose.

Par la même approche, Mandal *et al.* ont développé des NPs inorganiques d'or de 20 et 30 nm de diamètre et fonctionnalisées en surface avec du tréhalose [90]. Ces NPs inhibent efficacement l'agrégation des protéines mutantes à l'intérieur de la cellule et améliorent ainsi la survie cellulaire vis-à-vis des agrégats de protéines toxiques dans le cas de la maladie d'Huntington. L'internalisation des NPs dans des neuroblastomes de souris ainsi que la diminution du nombre d'agrégats d'Huntingtine ont été confirmées par microscopie de fluorescence. Ces résultats corroborent ceux de la littérature : la fonctionnalisation du tréhalose en surface des NPs est un élément clé pour augmenter sa bioactivité.

Les propriétés d'induction de l'autophagie par le tréhalose ont été étudiées par Colombo *et al.* à partir de conjugués nano-lipide-tréhalose [91]. Ces nano-objets, composés de conjugués squalène-tréhalose et acide bétulinique-tréhalose sont formés par la technique d'évaporation de solvant après nanoprecipitation. En fonction de la nature des nano-lipides, des particules chargées négativement (~ -25 mV), de diamètres compris entre 90 et 463 nm et monodisperses (PDI < 0,130) ont été obtenues. Leur cytotoxicité a été évaluée *in vitro* sur des cellules HeLa pour une concentration en tréhalose de 20 μM ou 40 μM , après 2h et 48h d'incubation à 37°C. Aucune toxicité significative de l'ensemble des NPs n'a été observée. La capacité d'induction de l'autophagie du tréhalose a été vérifiée par Western Blot et plus précisément par suivi de la conversion en isoforme LC3-II. Les trois suspensions n'ont montré aucun effet dans l'induction de l'autophagie, mais les auteurs ont supposé que la concentration en tréhalose était trop faible pour obtenir un effet bénéfique et ont également invoqué une dégradation trop rapide des nano-objets. Toutefois, l'ensemble de ces recherches a ouvert la voie au développement de nouveaux traitements pour les maladies neurodégénératives utilisant les nanotechnologies comme système de délivrance. Il serait notamment intéressant de développer de nouveaux types d'objets encapsulant le tréhalose pour étudier plus en détail le potentiel de tels nanosystèmes.

Chapitre IV : Les nucléolipides, des molécules d'intérêt biologique

1- Structure, occurrence et propriétés biologiques des nucléolipides

Le terme nucléolipide (NL) a été introduit pour la première fois en 1980 par Smrt et Hynie [152]. Les NLs sont des molécules amphiphiles bifonctionnelles généralement constitués d'une tête polaire hydrophyle de type acide nucléique associée à une queue hydrophobe (**Figure 17**).

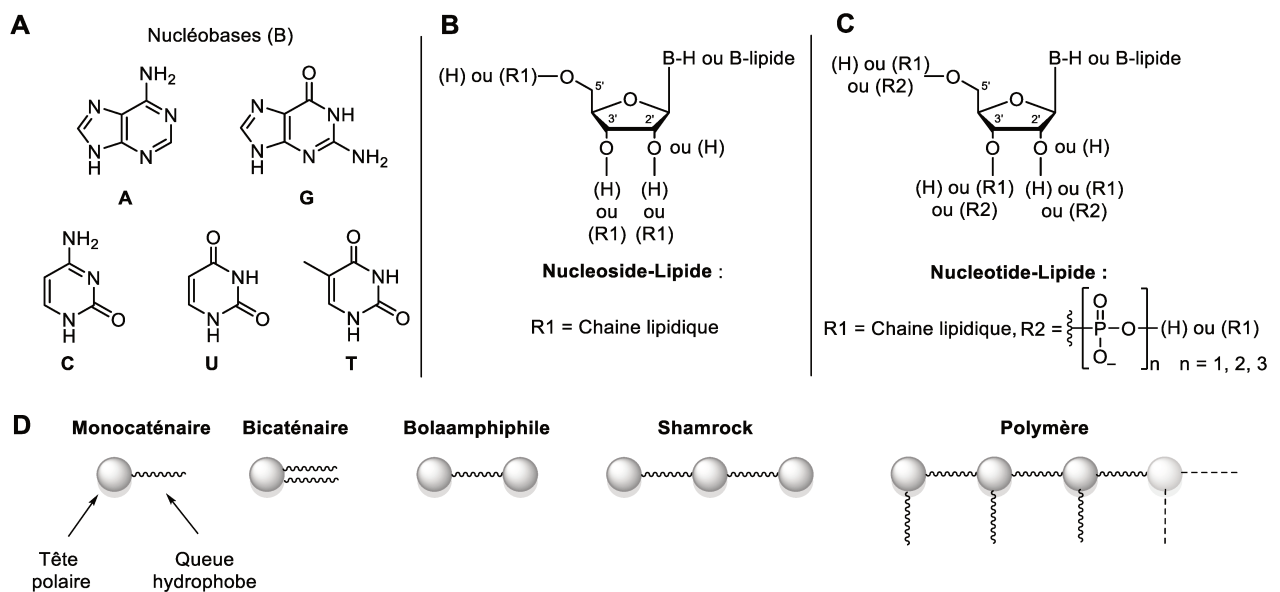


Figure 17. La grande variété structurale des nucléolipides. Les différentes nucléobases purines (Adénine (A) et Guanine (G)) et pyrimidines (Cytosine (C), Uracile (U) et Thymidine (T)) (A), structure générale des nucléoside-lipides (B), structure générale des nucléotide-lipides (C), les différents types de structures à base de nucléolipides (D). Adapté de Godeau et al. [153].

Ces molécules présentent une grande variété structurale grâce à la nature de leur nucléobase, soit en série ADN ou ARN, mais également la nature de la chaîne lipidique. L'acide nucléique peut-être une nucléobase (purine ou pyrimidine), un nucléoside (nucléobase couplée à un sucre de type ribose ou désoxyribose), un nucléotide (nucléoside phosphorylé), ou un oligonucléotide. Ainsi, les NLs regroupent la famille des nucléobase-lipides, nucléoside-lipides, nucléotide-lipides, ou des lipides-oligonucléotide. La nature de la chaîne lipidique peut

être modulée pour former des composés monocaténaire ou bicaténaire, saturés ou insaturés, ou encore polycycliques. Enfin, les NLs peuvent posséder une structure de type bolaamphiphile, c'est à dire deux têtes polaires liées par une chaîne lipidique, ou encore de type Shamrock, composée de plusieurs têtes polaires liées par des chaînes lipidiques. Ces molécules amphiphiles peuvent être d'origine naturelle ou synthétique, et présentent pour certaines des propriétés biologiques très intéressantes.

1.1- Les nucléolipides d'origine naturelle

De nombreux NLs d'origine naturelle ont été mis en évidence, aussi bien dans les cellules procaryotes qu'eucaryotes, et plusieurs d'entre eux présentent des activités antimicrobiennes, antifongiques, antivirales et antitumorales [154]. Parmi les plus connus, on retrouve la Tunicamycine, la Liposidomycine B et la cytidine diphosphate diacylglycérol. Le premier NL antibiotique, la Tunicamycine (**Figure 18A**), fût isolé en 1971 à partir des bactéries *Streptomyces lysosuperficus* est composée d'une nucléobase de type uracile [155,156].

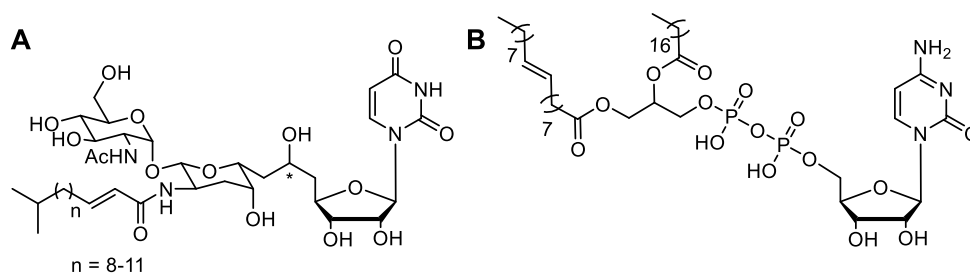


Figure 18. Structures chimiques de nucléolipides naturels. Structure de la Tunicamycine (A) et de la Cytidine diphosphate diacylglycerol (B).

Ce NL est actif *in vitro* contre les champignons, les levures, les bactéries Gram-positives et les virus. Son action sur les bactéries consiste à inhiber la glycosylation des protéines qui constituent leur paroi et qui sont de fait nécessaire à leur croissance et leur survie. De plus, la Tunicamycine est un inhibiteur de la synthèse des oligosaccharides dans les cellules eucaryotes. Ainsi, ce composé monocaténaire est souvent utilisé comme sonde biochimique [157] ou comme outil dans l'étude des mécanismes de biosynthèse microbienne mais également pour l'étude des effets antibiotiques des nucléosides. Issus de la même famille de bactéries, les liposidomycines sont des antibiotiques naturels ne présentant aucune toxicité pour les

organismes eucaryotiques contrairement à la Tunicamycine [158]. Ces NLs sont également connus pour leurs propriétés d'inhibition de la synthèse des peptidoglycanes.

La cytidine diphosphate diacylglycérol (**Figure 18B**), également appelée CDP-DAG, est le NL naturel le plus commun. Identifié pour la première fois dans les années 60 par Kennedy *et al.* elle est impliquée dans la biosynthèse de glycolipides et de lipoprotéines. Cette molécule est un intermédiaire lipidique central chez les eucaryotes et procaryotes pouvant transférer des groupes acides phosphatidiques vers des groupes hydroxyles présents dans les sucres ou les protéines pour former des glycolipides ou des lipoprotéines. De plus, elle joue un rôle central dans la synthèse des phospholipides membranaires tels que le phosphatidylinositol et la cardioline [159].

À côté des NLs naturels, le développement de NLs synthétiques a fait l'objet d'un intérêt croissant de la part des chimistes de synthèse pour en diversifier les propriétés et conduire à des auto-assemblages, à des propriétés physico-chimiques ou encore biologiques contrôlées et modulées en fonction de la modification chimique apportée.

1.2- Les Nucléolipides synthétiques

Les fonctionnalisations chimiques permettent de modifier les propriétés physico-chimiques des composés, afin d'améliorer l'efficacité de la substance active en fonction de l'application souhaitée. De nombreuses études décrivent des NLs issus de la Gemcitabine qui permettant d'améliorer sa biodistribution et son activité biologique [160].

La Gemcitabine est une molécule analogue de la désoxycytidine commercialisée en 1996 sous le nom de Gemzar[®]. Elle possède des propriétés anti-cancéreuses en exprimant une activité cytotoxique significative sur diverses cellules murines et tumorales [161]. Une fois administrée, la Gemcitabine est internalisée au sein des cellules d'intérêts avant d'être phosphorylée et incorporée dans l'ADN, conduisant ainsi à l'arrêt de l'élongation de l'ADN ainsi que du cycle cellulaire et donc à la mort cellulaire. Cependant, son efficacité reste modérée notamment à cause de sa toxicité, sa faible biodisponibilité orale ou encore sa courte demi-vie. Afin de contourner ces limitations, Shoukath *et al.* ont développé un dérivé de la Gemcitabine couplé à une chaîne cardioline [162]. Ce nouveau composé possède une toxicité plus faible ainsi qu'une efficacité supérieure au Gemzar[®] vis-à-vis des cellules tumorales (**Figure 19A**).

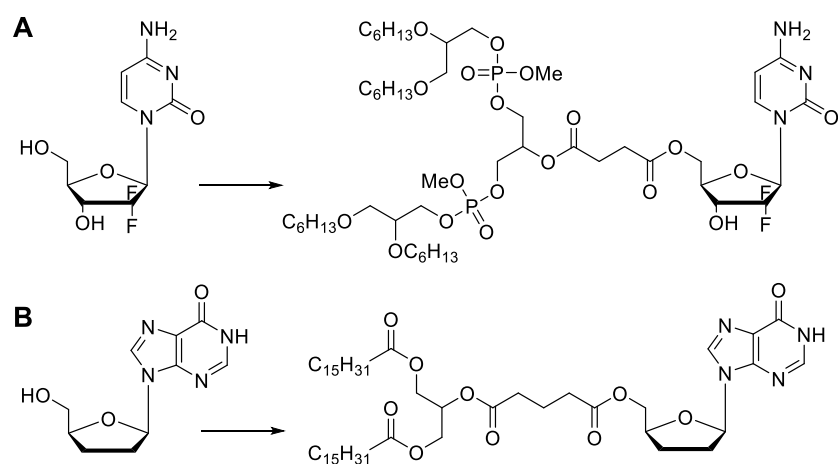


Figure 19. Structures chimiques de nucléolipides synthétiques. *Structure de la Gemcitabine et le conjugué Gemcitabine-lipide (A) et de la Didanosine et son dérivé nucléolipidique (B).*

Un autre NL synthétique modèle est la didanosine, une pro-drogue commercialisée sous le nom de Videx[®] [163]. Il s'agit d'un anti-rétroviral de la réplication des virus VIH-1 et VIH-2, approuvé en 1991 par la FDA. Une fois les membranes cellulaires traversées, la didanosine est métabolisée sous sa forme active (didésoxyadénosine 5'-triphosphate) efficace contre la transcriptase inverse du VIH-1 en entrant en compétition avec le substrat naturel. En s'incorporant à l'ADN viral, il entraîne l'arrêt de la transcription. Malgré son efficacité, la didanosine ne guérit pas les patients infectés par le VIH mais diminue la quantité de virus dans le corps, qu'elle maintient à un faible niveau. À cause de sa dégradation acide dans l'estomac et de sa médiocre absorption, la didanosine souffre d'une faible biodisponibilité (20-40%). Pour contourner cette limitation, de nombreux dérivés lipidiques de la didanosine possédant une meilleure biodisponibilité ont été développés (**Figure 19B**). Par ailleurs, ces bioconjugués ont montré une activité anti-rétrovirale similaire à la molécule seule en solution après administration par voie orale [163].

En conclusion, les NLs naturels ou synthétiques possèdent des activités biologiques notables. De plus, leur caractère amphiphile leur permet de s'auto-assembler dans les milieux aqueux pour donner des objets supramoléculaires divers et variés pouvant être pertinents dans la conception de biomatériaux et de systèmes de délivrance de substances actives.

2- Propriétés d'auto-assemblage des nucléolipides

La structure amphiphile des NLs associée à la complémentarité des nucléobases leur confère des propriétés à la fois d'auto-assemblage et de reconnaissance moléculaire uniques, toutes gouvernées par des interactions faibles intermoléculaires (**Figure 20**) [164].

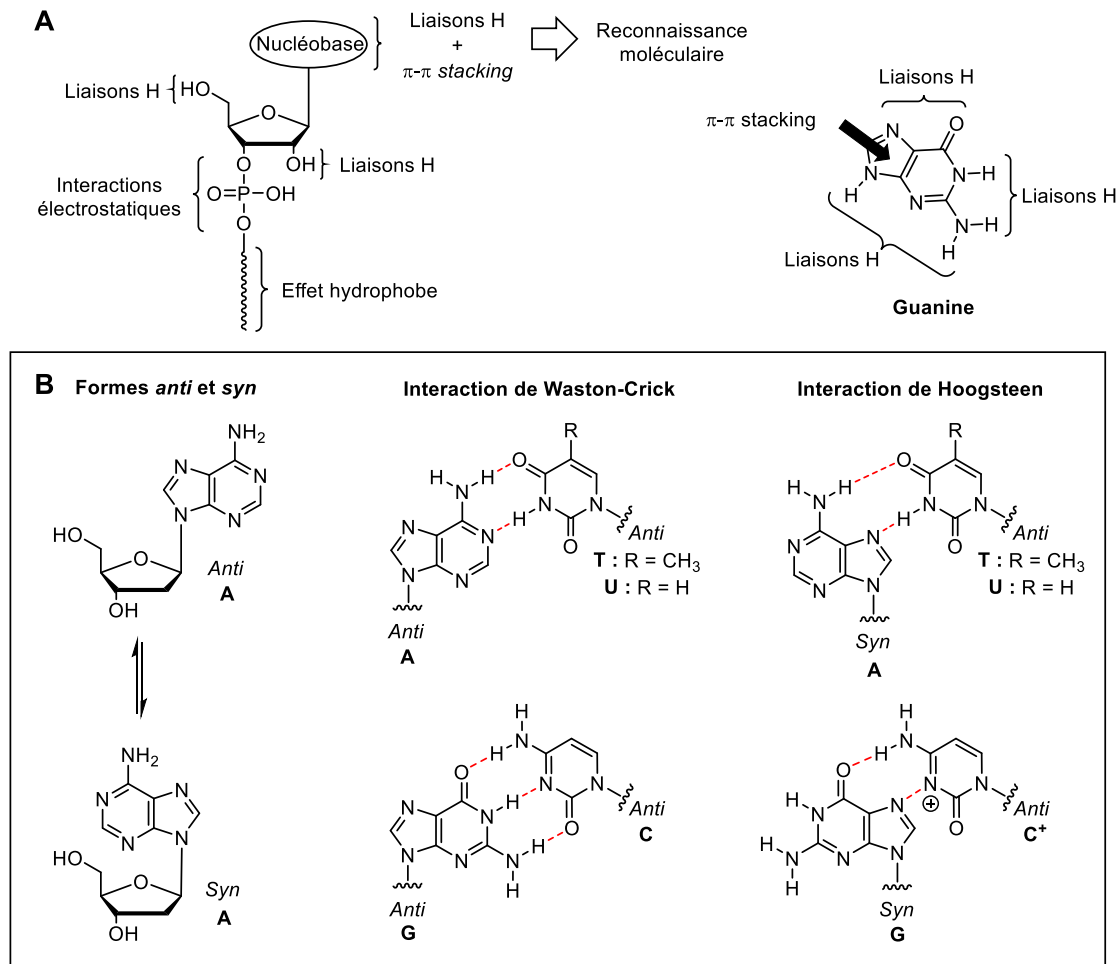


Figure 20. Les différents types d'interactions. Exemples d'interactions faibles, liaisons hydrogène entre nucléobases et π - π stacking, présentes sur une structure de type nucléolipide (A), et les conformations *anti* et *syn*, ainsi que les interactions de Watson-Crick et de Hoogsteen (B).

En premier lieu, la tête polaire des NLs est capable d'interagir avec d'autres nucléobases via des liaisons hydrogène pour donner deux types d'appariement : celui de Watson-Crick et celui de Hoogsteen. L'appariement de Watson-Crick, le plus observé, repose sur la formation d'interactions sélectives entre deux nucléobases en conformation *anti* (A avec T ou U, et C avec G). Ces interactions permettent d'obtenir des hélices, simple ou double brins, constitutives de

l'ADN ou de l'ARN. L'appariement de Hoogsteen est quant à lui décrit par les interactions entre une pyrimidine en conformation *syn* et une purine en conformation *anti*. D'autres types d'interactions peuvent également être observées entre trois nucléobases, deux nucléobases identiques et par médiation *via* un métal. De même, la présence d'un squelette sucre (ribose ou désoxyribose), peut également donner lieu à des liaisons hydrogène grâce à l'hydroxyle libre en position 3', 4' ou 5'. De plus, les nucléobases de nature hétéro-aromatique sont également le site d'interactions de type π - π stacking (**Figure 20**) [165]. De simples NLs dans des agrégats micellaires ou vésiculaires peuvent présenter des propriétés de reconnaissance entre des bases complémentaires similaires à celles de l'ADN.

Enfin, les forces de Van der Waals interviennent elles aussi dans la stabilisation des structures formées (**Figure 20**). Le fragment lipidique hydrophobe confère un caractère amphiphile à la molécule, pouvant impacter plus ou moins la structure supramoléculaire obtenue en fonction du nombre de chaînes, de la longueur de chaîne, du degré d'insaturation et de sa position par rapport à la nucléobase.

Les NLs peuvent être classés en différentes familles en fonction de leur charge : neutre, anionique, cationique et zwitterionique. Les premiers NLs ioniques à avoir présenté des perspectives prometteuses *in vitro* sont les NLs cationiques tels que la DOTAU étudiée par l'équipe de recherche de Philippe Barthélémy (**Figure 21A**) [166].

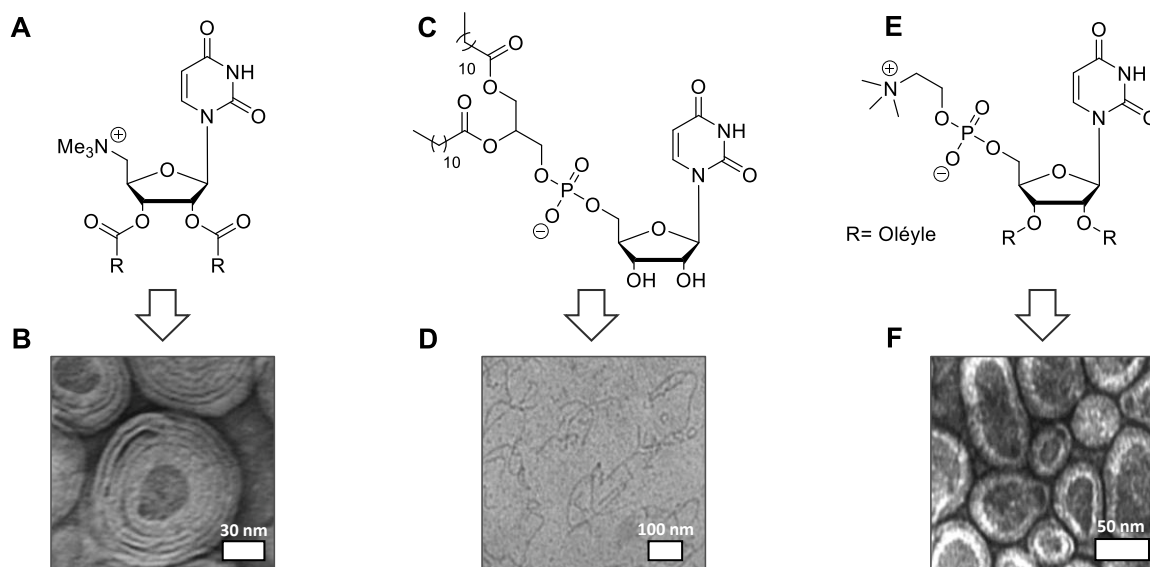


Figure 21. Structures chimiques de divers nucléolipides. Structure de la DOTAU (A), DLPU (C), et DOUPC (E). Images de TEM ou Cryo-TEM des lipoplexes de DOTAU (B), des micelles de DLPU (D) et des vésicules unilamellaires de DOUPC (F). Adapté de Chabaud et al., Milani et al., Moreau et al. [166–168].

Les NLs cationiques se distinguent par la présence d'une charge positive généralement apportée par un groupement ammonium. L'intérêt de ces NLs repose sur la formation d'un complexe stable à partir d'interactions électrostatiques fortes avec des espèces chargées négativement qui jouent un rôle important dans les phénomènes d'assemblage. Ces NLs sont largement utilisés pour vectoriser les brins d'acides nucléiques *via* la formation de lipoplexes (complexe liposome/ADN) (**Figure 21B**). Cependant, leurs interactions avec les protéines plasmiques *in vivo* les rendent cytotoxiques lorsqu'ils sont administrés par voie systémique [169]. Dès lors, d'autres types de NLs, anioniques et zwitterioniques, ont été développés présentant par exemple une faible cytotoxicité dans le cas des NLs anioniques.

Les NLs anioniques sont généralement constitués d'un nucléotide, dont la charge provient du ou des groupement(s) phosphate(s) en position 2', 3' ou 5'. Néanmoins, à l'inverse des NLs cationiques, la complexation des acides nucléiques (eux-mêmes chargés négativement) par des structures anioniques est plus difficile. Le 1,2-dilauroyl-phosphatidyluridine (DLPU) par exemple (**Figure 21C-D**) peut s'organiser sous forme de phases lamellaires reposant sur la reconnaissance moléculaire, deux brins de même charge s'appariant grâce à une sélectivité chimique qui surmonte la répulsion électrostatique [167].

Les molécules zwitterioniques ou amphotères, comme le DOUPC (1,2-dioléoyluridinophosphocholine), se caractérisent par la présence de deux charges opposées (**Figure 21E**). Dans certains cas, les molécules peuvent se présenter à l'état neutre à pH physiologique, ou cationique à pH acide ou anionique en milieu basique. Elles peuvent également s'auto-assembler comme les autres types de nucléolipides pour former des vésicules (**Figure 21F**) ou des fibres qui en interagissant entre elles peuvent donner des hydrogels ou organogels à des températures inférieures à la température de transition gel-sol, et des phases lamellaires au-dessus de cette température [168].

Enfin, certains nucléolipides non-ioniques ont été développés ces dernières années pour être utilisés en co-formulation avec des lipides ou des nucléolipides ioniques dans la formation d'auto-assemblages. Cuomo *et al.* ont notamment développé la lauroyl uridine et l'ont couplé à un lipide cationique, la DOTAP (chlorure de N-[1-(2,3-dioléoyloxy)-propyl]-N',N',N'-triméthylammonium), pour former des liposomes [170]. Ils ont également montré que la présence de lauroyl uridine dans la formulation facilite la complexation avec un polynucléotide poly-A grâce aux interactions entre nucléobases.

Les organisations supramoléculaires particulières formées par les NLs sont donc intimement liées à leur nature chimique : l'établissement de différents types d'interactions faibles intermoléculaires donnent lieu à différentes morphologies telles que des vésicules, des phases lamellaires, des rubans, ou encore des brins hélicoïdaux. Ces organisations peuvent être observées au-delà de la concentration critique micellaire de la molécule amphiphile dans des milieux organiques ou aqueux[169]. De manière générale, la partie hydrophobe s'organise selon sa nature, sa taille et le nombre de chaînes carbonées [171], et la partie hydrophile selon la nature des nucléobases, des charges, ou encore des modifications chimiques apportées au niveau des nucléosides [172].

Bien que la formation d'une organisation supramoléculaire au détriment d'une autre soit difficile à prédire, des paramètres basés sur la forme générale du NL peuvent en partie expliquer la structure de l'auto-assemblage formé. En 1976, le physicien et ingénieur chimiste israélien Israelachvili émet l'hypothèse que la formation d'un assemblage supramoléculaire dépend du rapport entre le volume de la tête polaire et de la queue hydrophobe [173] (**Figure 22**).

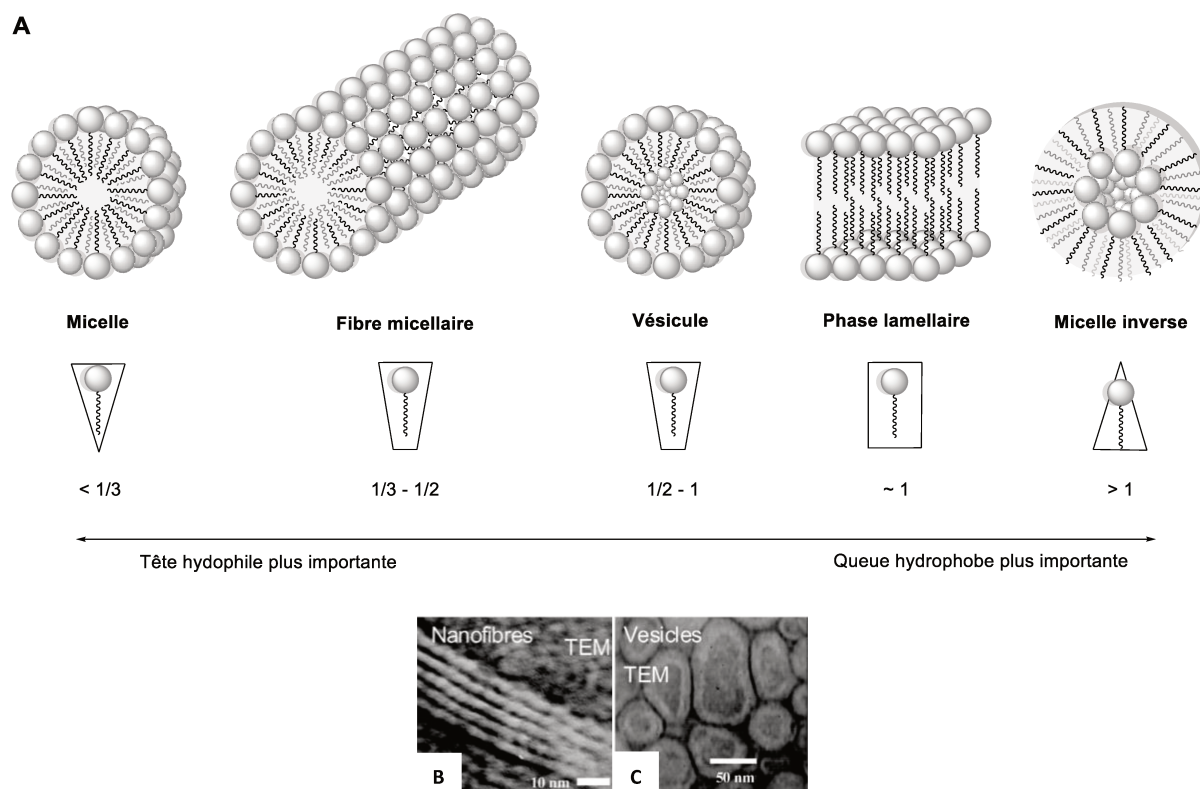


Figure 22. Les propriétés d'auto-assemblage des nucléolipides. (A) Les différents types d'auto-assemblage possible des NLs selon leur structure. Images TEM de structures issues de l'auto-assemblage (B) de nanofibres et (C) de vésicules, issues de Barthélémy et al. [174].

Les monocouches et bicouches de NLs fournissent des micelles cylindriques ou inverses (**Figure 22A**). Les micelles sont formées à partir d'un repliement de la monocouche nucléolipidique, la tête polaire se situant à l'interface avec la phase aqueuse et la chaîne lipidique à l'intérieur. De la sorte, un espace hydrophobe est créé et peut être utilisé pour encapsuler des substances actives hydrophobes. Dans le cas des micelles inverses, la partie hydrophile de la micelle est repliée vers l'intérieur et la partie hydrophobe vers l'extérieur, ce qui permet l'encapsulation de molécules hydrophiles. La stabilité colloïdale de cette structure est assurée par les différentes interactions existantes entre les têtes polaires ainsi qu'entre les chaînes lipidiques. Au contraire, les NLs peuvent former une bicouche lorsqu'ils s'organisent suivant un enchaînement de type tête-queue-queue-tête pour conduire à des phases lamellaires ou des vésicules. En effet, la formation de vésicules est observée lorsqu'une bicouche nucléolipidique flexible se replie sur elle-même. À l'inverse, une phase lamellaire est obtenue si la bicouche est plane. La morphologie des auto-assemblages peut donc, en partie, être expliquées par la courbure locale des bicouches, observables par microscopie électronique à transmission (MET) ou à balayage (MEB) (**Figure 22B-C**) [174].

Ces molécules amphiphiles aux caractéristiques uniques combinent les interactions spécifiques d'appariement entre nucléobases et les propriétés d'agrégation des lipides, conduisant à des assemblages supramoléculaires originaux valorisables pour diverses applications biomédicales. L'équipe ChemBioPharm possède depuis plusieurs années une expertise reconnue dans la conception, la synthèse et l'étude physicochimique de biomatériaux originaux pour les domaines médicaux ou environnementaux (théranostique, transport de molécules actives, ingénierie tissulaire, médecine régénérative, bio-impression 3D, décontamination, ...). Oumzil et collaborateurs, par exemple, ont rapporté la conception de SLNs nucléolipidiques encapsulant des particules d'oxide de fer et de substances actives comme approche théranostique pour le traitement de l'athérosclérose [175]. Deux systèmes de SLNs ont été développées à partir du nucléolipide cationique DOTAU et du nucléolipide anionique diC₁₆dT. Les SLNs ont été formulés par nanoprecipitation d'une solution organique de nucléolipides et de nanoparticules d'oxide de fer dans une phase aqueuse. Ainsi, des diamètres compris entre 80 et 98 nm et de charge de surface de +55 et -27 mV, respectivement pour la DOTAU et la diC₁₆dT (1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphate-désoxythymidine), ont été obtenues. Ces nano-objets ont montré des propriétés magnétiques supérieures aux contrastants commerciaux (Feridex[®]) lors du suivi de la progression de la maladie par imagerie par résonance magnétique.

Outre leur utilisation dans diverses applications biomédicales, les NLs ont également été utilisés comme bloc de construction dans des nanoformulations pour faciliter le passage des membranes, dont celle de la BHE [176,177]. Ils sont ainsi considérés comme d'excellents candidats dans le cadre des maladies neurodégénératives et plus particulièrement la maladie de Parkinson.

3- Nucléolipides et passage des membranes biologiques

De par leur nature amphiphile et leur ressemblance avec la double couche lipidique qui compose la paroi cellulaire, les NLs ont la capacité de traverser plus facilement la membrane cellulaire, avec ou sans l'aide de transporteurs membranaires. Des travaux récemment publiés par Swastika *et al.* tendent notamment à démontrer que des NLs convenablement fonctionnalisés franchissent la BHE [176]. Bien que le mécanisme exact de perméabilité de la BHE reste encore à étudier, il semblerait que les nucléosides naturels soient internalisés par les récepteurs et transporteurs de nucléosides lorsque leurs analogues modifiés non reconnus par ces récepteurs franchissent la BHE par diffusion passive. Les nucléolipides similaires aux nucléosides modifiés dépendent des mécanismes de diffusion passive.

Enfin des travaux antérieurs de l'équipe ChemBioPharm, en collaboration avec l'IMN, ont décrit la conception de vecteurs chimiques modèles de type nucléolipidiques pour le traitement de la maladie de Parkinson [177]. Ces nucléolipides ont été synthétisés à partir de la thymidine et fonctionnalisés par une chaîne lipidique C16 en position 3' ou 5' des nucléosides. Les NLs ont ensuite été formulés en NEs afin d'améliorer le passage des membranes biologiques et d'augmenter leur protection contre la dégradation enzymatique. Après validation de la stabilité colloïdale des nanoémulsions sur 20 jours, des essais biologiques *in vitro* ont permis d'évaluer la cytotoxicité et l'internalisation des NEs au sein de neurones humains de type BE(2)-M17. Pour assurer le suivi des nanosystèmes en milieu biologique, les NLs ont été fonctionnalisés avec un fluorophore, la Rhodamine B. La biocompatibilité des NEs a été validée, ainsi que l'internalisation et la colocalisation avec les lysosomes, indispensable au traitement de la maladie de Parkinson (**Figure 23, annexe**).

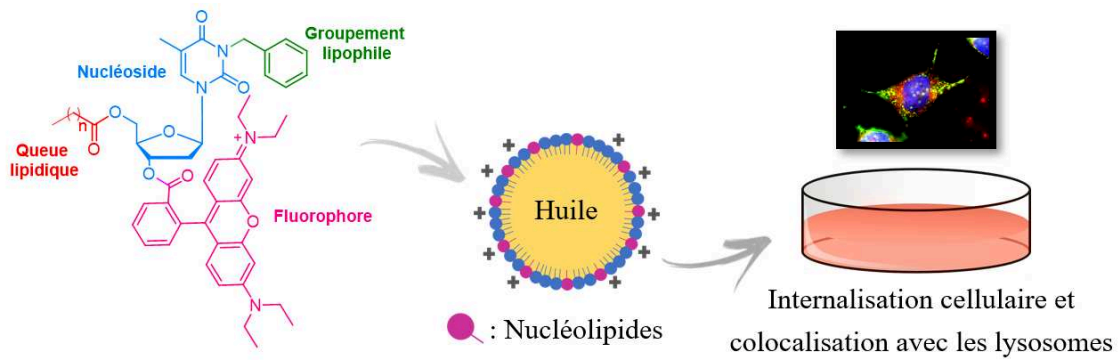


Figure 23. Synthèse et internalisation cellulaire de conjugués Rhodamine–nucléolipide encapsulés dans des nanoémulsions. *Des dérivés nucléolipidiques ont été synthétisés puis formulés sous forme de nanoémulsions afin d’étudier le potentiel de ce type de nanotechnologies in vitro, adapté de Cunha et al..*

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les nucléolipides sont des molécules bio-inspirées et biocompatibles aux propriétés originales de reconnaissance moléculaire et d'auto-assemblage. Ces propriétés en font des molécules de choix pour le passage des membranes biologiques et pour la formation de nano-objets tels que les SLNs. Les nanotechnologies, et plus particulièrement les NPs de PLGA et les SLNs, constituent des vecteurs de choix pour l'administration de substances actives. Compatibles avec le milieu biologique, ils permettent d'augmenter la biodisponibilité et la stabilité des substances thérapeutiques tout en possédant une grande capacité de fonctionnalisation qui leur permet de cibler les sites pathologiques de nombreuses maladies, dont les maladies neurodégénératives. De nombreuses études ont fait l'état de la possibilité d'utiliser les NPs de PLGA et les SLNs pour traverser la BHE pour l'administration de substances actives au sein du SNC.

Ce travail de thèse a consisté dans un premier temps à étudier les propriétés biologiques de restauration du pH lysosomal au moyen de NPs de PLGA. Des tests *in vitro* et *in vivo* ont été effectués afin de montrer que ces NPs protègent les neurones dopaminergiques de la mort cellulaire, améliorent la synucléinopathie et restaurent l'altération de la fonction lysosomale chez un modèle murin de la maladie de Parkinson.

Dans un deuxième temps, une nouvelle génération de NucléoLipides-tréhalose (ou GNL pour GlycoNucléoLipides) a été étudiée pour l'administration et la libération *in vitro*, et à l'avenir *in vivo*, de tréhalose. Leur structure chimique a été développée afin d'obtenir des composés suffisamment lipophiles pour être formulés sous différentes formes de nanosystèmes (NPs de PLGA et SLNs). Ces nanosystèmes ont ensuite été évalués *in vitro* sur une lignée de neuroblastomes humains afin de développer des vecteurs non toxiques compatibles avec le milieu biologique. La capacité des NPs de PLGA et des NPs solides lipidiques à délivrer du tréhalose au sein de neurones humains ainsi que leurs propriétés d'induction de l'autophagie des GNLs ont également été confirmées.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre V : Intérêt des NPs de PLGA pour la restauration du pH lysosomal

Les lysosomes jouent un rôle essentiel à la survie neuronale grâce notamment à leur système de dégradation des éléments toxiques tels que l' α -synucléine. Les mécanismes d'autophagie par les lysosomes mettent en jeu la fusion d'autophagosomes avec les lysosomes, formant ainsi les autolysosomes. Le pH intérieur des lysosomes est régulé par une pompe à protons, nommée V-ATPase, qui permet de maintenir un pH d'environ 4-5 nécessaire au bon fonctionnement des enzymes lysosomales [178]. Néanmoins, comme décrit dans la première partie de l'état de l'art, un des facteurs de la maladie de Parkinson est une défaillance de la fonction lysosomale. L'un des événements menant à cette dysfonction des voies autophagiques-lysosomales peut être la mutation de gènes codant pour des protéines lysosomales (tel que l'ATPase type 13A2) notamment associée à une alcalinisation de la lumière du lysosome, à une réduction de leur capacité de dégradation, ...

En 2016, Bourdenx *et al.*, exploitent les propriétés acides exprimées par la dégradation du PLGA plutôt que sa fonction de nanovecteur. En traitant des modèles de la maladie de Parkinson *in vitro* (modèles neurotoxiques et génétiques) et *in vivo* (modèles neurotoxiques), par des NPs de PLGA, ils montrent qu'il est possible de restaurer le pH lysosomal avec un effet direct sur l'issue de la maladie de Parkinson (**Figure 24**).

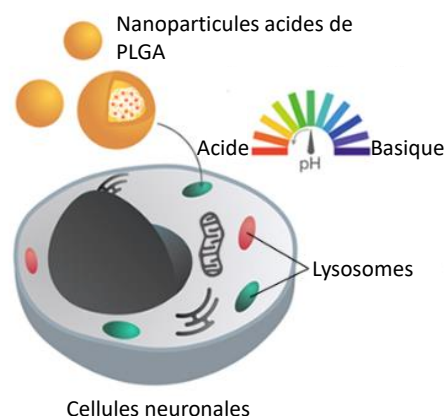


Figure 24. Les NPs de PLGA pour le traitement de la maladie de Parkinson. Utilisation de l'acidité du PLGA pour restaurer le pH lysosomal et l'activité autophagique.

Plus récemment, j'ai participé à une étude pour laquelle des NPs de PLGA ont été préparés par nanoprecipitation suivant un protocole décrit précédemment dans la littérature [136]. De forme sphérique, elles possèdent un diamètre moyen de $149,8 \pm 0,9$ nm, et un potentiel zêta de $-41,5 \pm 0,8$ mV. Nous démontrons ici *in vitro* et *in vivo* dans un contexte où l' α -synucléine est le déclencheur pathologique, que ces NPs de PLGA sont une stratégie efficace pour le traitement de la maladie de Parkinson et d'autres synucléinopathies. Nous avons dans un premier temps confirmé *in vitro* que ces nanoobjets étaient capables de restaurer la fonction et l'intégrité des lysosomes par la ré-acidification de la lumière lysosomale dans les cellules surexprimant l' α -synucléine. Des tests supplémentaires ont permis de déterminer que leurs propriétés d'induction de l'ALP permettent une dégradation plus efficace de l' α -synucléine. Dans un deuxième temps nous montrons que l'injection de NPs de PLGA *in vivo* permet :

- de prévenir la neurodégénérescence dopaminergique induite par l' α -synucléine ;
- de réduire les synucléinopathies ;
- de restaurer la fonction lysosomale dans la substantia nigra pars compacta de souris.

Les résultats de cette étude ont donné lieu à un article soumis dans le journal *Aging Cell* (ACE-21-0586).

Acidic nanoparticles protect against α -synuclein-induced neurodegeneration through the restoration of lysosomal function

Marie-Laure Arotcarena^{1,‡}, Federico N. Soria^{1,2,‡}, Anthony Cunha^{1,3,‡}, Evelyne Doudnikoff¹, Geoffrey Prévot^{1,3,4}, Jonathan Daniel⁵, Mireille Blanchard-Desce⁵, Philippe Barthélémy³, Erwan Bezar¹, Sylvie Crauste-Manciet³ and Benjamin Dehay^{1,*}

Affiliations

¹ Univ. Bordeaux, CNRS, IMN, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France.

² Achucarro Basque Center for Neuroscience, Dpto. Neurociencias, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), 48940 Leioa, Spain.

³ Université de Bordeaux, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, ARNA ARN: Régulations Naturelle et Artificielle, ChemBioPharm, 33076 Bordeaux, France.

⁴ Current address: Biomedical Engineering and Imaging Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA.

⁵ Université de Bordeaux, Institut des Sciences Moléculaires, CNRS UMR 5255, 33400 Talence, France

‡M-L. Arotcarena, F. N. Soria and A. Cunha contributed equally to this work

*Correspondence should be addressed to: Dr. Benjamin Dehay, Institut des Maladies

Neurodégénératives, Université de Bordeaux, CNRS UMR 5293, Centre Broca Nouvelle-

Aquitaine, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France. E-mail: [benjamin.dehay@u-](mailto:benjamin.dehay@u-bordeaux.fr)

[bordeaux.fr](mailto:benjamin.dehay@u-bordeaux.fr) (B.D.)

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is an age-related neurodegenerative disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, associated with the accumulation of misfolded α -synuclein and lysosomal impairment, two events deemed interconnected. Protein aggregation is linked to defects in degradation systems such as the autophagy-lysosomal pathway, while lysosomal dysfunction is partly related to compromised acidification. We have recently proven that acidic nanoparticles (aNPs) can re-acidify lysosomes and ameliorate neurotoxin-mediated dopaminergic neurodegeneration in mice. However, no lysosome-targeted approach has yet been tested in synucleinopathy models *in vivo*. Here we show that aNPs increase α -synuclein degradation through enhancing lysosomal activity *in vitro*. We further demonstrate *in vivo* that aNPs protect nigral dopaminergic neurons from cell death, ameliorate α -synuclein pathology, and restore lysosomal function in mice injected with PD patient-derived Lewy body-extracts carrying toxic α -synuclein aggregates. Our results support lysosomal re-acidification as a disease-modifying strategy for the treatment of PD and other age-related proteinopathies.

Keywords: acidic nanoparticles; *in vivo*; lysosomal restoration; Parkinson's disease; α -synuclein, neurodegeneration, therapeutics.

Abbreviations: α -syn: α -synuclein; AL: autophagolysosome; ALP: autophagy-lysosomal pathway; aNPs: acidic nanoparticles; AP: autophagosome; BafA: bafilomycin A₁; CMA: chaperone-mediated autophagy; LB: Lewy Body; LC3: MAP1LC3B, microtubule-associated protein 1 light chain 3 β ; LMP: lysosomal membrane permeabilization; NPs: fluorescent

organic nanoparticles; PD: Parkinson's disease; PLGA: poly(D,L-lactide-co-glycolide); ROI: region of interest; SNpc: substantia nigra *pars compacta*; TH: tyrosine hydroxylase; UPS: ubiquitin-proteasome system.

For Peer Review

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is an age-related, chronically progressive and incurable neurodegenerative disorder, carrying great socio-economic burden and impairing the elderly life of millions (Tysnes & Storstein, 2017). So far, the most consistent risk factor for developing PD is increasing age. PD is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc), which translates into the disruption of basal ganglia signaling and subsequent motor and cognitive deficiency. While the pathogenic mechanisms leading to PD are still not fully understood, a wealth of information points at a prominent role of α -synuclein (α -syn) (Dehay et al., 2015), an abundant neuronal protein involved in synaptic transmission (Logan, Bendor, Toupin, Thorn, & Edwards, 2017). While α -syn exists typically as an unfolded monomer, it acquires a toxic conformation and aggregate over the years in PD and related synucleinopathies (i.e., pathologies characterized by an accumulation of misfolded α -syn), materializing as intracellular inclusions termed Lewy bodies (LB), often found in post-mortem PD brains (Spillantini et al., 1997).

In addition, damaged and misfolded proteins accumulate during the ageing process, when protein clearance systems might become less efficient, as illustrated by a decreased activity of both proteasomal and autophagic degradation pathways (Kaushik & Cuervo, 2015). The combination of ageing and PD pathological changes could lead to a cellular stress condition that interferes with intracellular clearance pathways, favours α -synuclein aggregation, and contributes to α -syn-mediated toxicity.

Lysosomal dysfunction is a significant event in proteinopathies (Nixon, 2013) recently associated with the two main neuropathological hallmarks of PD: dopaminergic neuronal cell death and accumulation of misfolded α -syn (Dehay et al., 2013; Wallings, Humble, Ward, & Wade-Martins, 2019). Impairment of lysosomal function, which is often associated with compromised acidification (Bagh et al., 2017; Dehay et al., 2012; Song, Meng, Xu, & Mao,

2020), leads to defective protein and metabolite processing, leading to congestion of intracellular clearance systems. Since intracellular α -syn species undergo degradation by either the ubiquitin-proteasome system (UPS) (Bennett et al., 1999) or the autophagy-lysosomal pathway (ALP) (Cuervo, Stefanis, Fredenburg, Lansbury, & Sulzer, 2004), strategies enhancing these protein quality control machineries emerge as an attractive approach to reduce critical levels of toxic α -syn (Dehay et al., 2016).

The re-acidification of lysosomes has been suggested as a viable strategy in animal models of lysosomal storage disorders (Folts, Scott-Hewitt, Proschel, Mayer-Proschel, & Noble, 2016), which share risk-factor genes and common pathogenic mechanisms with PD (Fraldi, Klein, Medina, & Settembre, 2016). Biocompatible poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles are state-of-the-art tools for drug delivery *in vivo*, particularly useful in disease models since they can be internalized by targeted cells, including neurons (Cunha, Gaubert, Latxague, & Dehay, 2021; Sahay, Alakhova, & Kabanov, 2010). By exploiting the acidic properties of PLGA, rather than its functionality as a nanocarrier, we and others have demonstrated that these acidic nanoparticles (aNPs) can restore lysosomal acidification defects in a pathological context with a direct effect on the disease outcome (Baltazar et al., 2012; Bourdenx et al., 2016; Guha, Liu, Baltazar, Laties, & Mitchell, 2014; Lee et al., 2015; Prevot et al., 2018; Senturk et al., 2019; van Veen et al., 2020; Xue et al., 2014). Nonetheless, while aNPs proved to be neuroprotective *in vitro* and *in vivo* in lysosomal-impairment models related to PD, it is yet to be determined whether aNPs-mediated lysosomal improvement affects α -syn degradation, and therefore, α -syn pathology.

Here we investigate whether aNPs could ameliorate PD-related phenotypes in mice injected with PD patient-derived LB-extracts carrying toxic α -syn aggregates (Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014; F. N. Soria, Paviolo, Doudnikoff, Arotcarena, et al., 2020). We show that aNPs injection *in vivo* can prevent α -syn-triggered dopaminergic

neurodegeneration, reduces α -syn pathology and restores lysosomal function in the SNpc of these mice while enhancing α -syn degradation and the ALP in neurons *in vitro*. These results confirm the therapeutic potential of aNPs and highlight lysosomal restoration as a disease-modifying strategy for treating PD and other age-related proteinopathies.

RESULTS

aNPs restore lysosomal function and integrity *in vitro*

We used aNPs to explore the effect of re-acidifying lysosomes in an α -syn context (**Fig. 1A**). aNPs adopt a spherical shape with a mean diameter of 149.8 ± 0.9 nm, and zeta potential values of -41.5 ± 0.8 mV (**Fig. S1**), as previously reported (Bourdenx et al., 2016). We have previously shown that BE(2)-M17 neuroblastoma cells are suitable neuronal cell lines that internalize aNPs into lysosomes through the endocytic pathway (Bourdenx et al., 2016) and that these aNPs can re-acidify defective lysosomes to basal levels and rescue impaired lysosomal function in BE (2)-M17 cells stably depleted of lysosomal type 5 P-type ATPase (ATP13A2), a PD cellular model (Bourdenx et al., 2016; Prevot et al., 2018). To precisely mimic increased levels of α -syn found in pathological neurons, we then employed BE(2)-M17 cells overexpressing human wild-type α -syn (M17-WTsyn) (Bisaglia et al., 2010). Fluorescent organic nanoparticles (NPs) are stable and water-soluble particles obtained by nanoprecipitation of hydrophobic dyes. These soft NPs, which are PLGA-free (i.e., no acidic behavior), were used as control for aNPs. *In vitro* cell viability assay confirmed that both types of nanoparticles do not induce cell death compared to untreated cells (**Fig. 1B**). We confirmed that aNPs were successfully and ultimately delivered to lysosomes, as evidenced by colocalization between the lysosomal marker LAMP2 and the Nile-red-loaded aNPs (**Fig. 1C**). Confocal optical sectioning and orthogonal projections of the resulting z-stacks confirmed the colocalization between another lysosomal marker LAMP1 and aNPs 24 h after

treatment (**Fig. S2**). Additional 3D reconstruction from z-stack, where aNPs are found within LAMP1-positive puncta, can be observed (**Supplementary Movie 1**), a similar result reminiscent of our previous study (Bourdenx et al., 2016).

To determine whether wild-type α -syn overexpression may impact the intraluminal pH of lysosomes, we measured lysosomal pH with LysoSensor Yellow/Blue DND-160. We observed that lysosomal pH acidification is compromised specifically in M17-WTsyn (**Fig. 1D**) in agreement with a recent study (Nascimento et al., 2020). Also, *in vitro* assays analyzing the activity of two lysosomal enzymes (i.e., ACP2 [acid phosphatase 2] and HEX/ β -hexosaminidase) in lysosomal fractions of M17-WTsyn cells confirmed a markedly reduced proteolytic activity of these enzymes relative to control cells (**Fig. 1E-F**). Treatment with aNPs was able to rescue both lysosomal pH alkalization (**Fig. 1D**) and proteolytic activity of lysosomal enzymes (**Fig. 1E-F**) in M17-WTsyn cells. These results indicate that wild-type α -syn overexpression impairs proper lysosomal acidification and proteolytic activity, which can be rescued by aNPs treatment.

Finally, we explored whether lysosomal integrity or stability were affected through lysosomal membrane permeabilization (LMP), a distinctive feature of lysosomal impairment (Boya & Kroemer, 2008). We measured the ectopic activity of three lysosomal-resident proteases, cathepsin-D (CatD), β -hexosaminidase, and acid phosphatase 2 (ACP2), in lysosomal-free cytosolic fractions from M17 and M17-WTsyn cells. Compared to control cells, α -syn overexpression triggered LMP as evidenced by a 3 to 5-fold increase in the cytosolic activity of CatD (**Fig. 1G**), β -hexosaminidase (**Fig. 1H**), and ACP2 (**Fig. 1I**) in M17-WTsyn cells, which were all rescued by aNPs treatment as measured in lysosome-free cytosolic fractions (**Fig. 1G-I**), suggesting a direct beneficial effect of aNPs on lysosomal membrane integrity in M17-WTsyn cells. Further supporting the occurrence of LMP in M17-WTsyn cells and the impact of aNPs, we measured galectin puncta at leaky lysosomes as a

highly sensitive assay for LMP. Accordingly, M17-WTsyn cells exhibited increased Gal3-positive vesicles per cell, using a mCherry-LGALS3/galectin-3 construct, which was entirely abolished by aNPs treatment (**Fig. 1J-K**). These results corroborate the feasibility of restoring LMP by aNPs treatment. Overall, these results indicate that aNPs can restore a proper lysosomal function and integrity in cells overexpressing wild-type α -syn.

aNPs increase α -syn degradation through ALP induction

While α -syn can be cleared by UPS, the main pathway for its degradation appears to be mediated by the lysosome (Webb, Ravikumar, Atkins, Skepper, & Rubinsztein, 2003). Because α -syn can be degraded by both macroautophagy (Vogiatzi, Xilouri, Vekrellis, & Stefanis, 2008) and chaperone-mediated autophagy (CMA) (Cuervo et al., 2004), we next explored whether aNPs could impact ALP, a system burdened by increased α -syn load (Arotcarena, Teil, & Dehay, 2019; Martinez-Vicente et al., 2008; Nascimento et al., 2020). To assess the impact of lysosomal re-acidification by aNPs, we examined the autophagy flux in cells overexpressing α -syn. M17-WTsyn cells were exposed to a concomitant treatment of aNPs and Bafilomycin A1 (BafA), an inhibitor of lysosomal acidification (**Fig. 2A-B**). As expected, levels of MAP1LC3B/LC3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3 β)-II were increased in both the control and aNPs-treated cells in the presence of BafA (**Fig. 2A-B**). However, the BafA+ aNPs combined group exhibited a higher level of LC3-II than the one in the aNPs or BafA alone treated groups (**Fig. 2A-B**). These results suggest that aNPs significantly induce autophagy flux in M17-WTsyn cells. To further validate this observation, M17 and M17-WTsyn cells were transfected with a plasmid carrying the dynamic tandem fluorescent reporter mCherry-GFP-LC3 (Castillo et al., 2013) prior to aNPs treatment. Here, the pH-sensitive GFP signal (**Fig. 2C-D**, green) is quenched by the lysosome's acidic environment, whereas the mCherry signal (**Fig. 2C-D**, red) is pH-insensitive. Thus,

autophagosomes (AP, not fused to lysosomes) are marked by both GFP and mCherry (yellow dots), whereas autophagolysosome (AL, fused to lysosomes) are characterized only by mCherry (red dots). In M17-WTSyn cells, we confirmed an accumulation of the two different types of vacuoles (red and yellow dots) and notably in the vacuole volume of yellow dots. In aNPs-treated M17-WTSyn cells, we observed a significant increase in AL number as shown by higher mCherry fluorescence intensity (**Fig. 2C-D**). Quantification of yellow puncta in aNPs-treated M17-WTSyn cells showed a considerable increment, indicating an increase in autophagosome numbers (**Fig. 2C-D**). These results suggest that aNPs significantly induce macroautophagy activity in these cells.

We next decided to evaluate the effect of aNPs treatment on CMA activity. Immunoblot analysis revealed accumulation of crucial players in CMA, LAMP2A and Hsc70, as well as undegraded CMA substrates, α -syn, GAPDH and MEF2D (Aniento, Roche, Cuervo, & Knecht, 1993; Yang et al., 2009) in M17-WTSyn cells (**Fig. 2E**). Interestingly, aNPs decreased α -syn levels to 50% in M17-WTSyn cells and restored LAMP2A, Hsc70, GAPDH, and MEF2D proteins to control levels (**Fig. 2E**), indicating that the degradation process inside the lysosome is rescued. To further corroborate aNPs-mediated recovery of CMA-dependent proteolysis, we then measured CMA activity dynamically in M17 and M17-WTSyn cells with a lentivirus expressing the photoswitchable CMA-targeted fluorescent substrate KFERQ-PS-Dendra (Koga, Martinez-Vicente, Macian, Verkhusha, & Cuervo, 2011). Upon 405 nm light exposure, Dendra protein is modified to emit red fluorescence, making it possible to track its delivery to lysosomes over newly synthesized protein. CMA activity is detected as a change from diffuse (cytosolic) fluorescence to a punctate (lysosomal) pattern. We observed that M17 cells exhibited a low cytosolic signal and some Dendra-positive fluorescent puncta, reflecting basal CMA activity (**Fig. 2F**). However, we observed a significantly reduced number of Dendra-positive puncta throughout the cytoplasm in M17-WTSyn cells, consistent

with reduced CMA activity (i.e., the KFERQ-PS-Dendra reporter is not being correctly degraded by CMA and accumulates in the cytosol). When cells were treated 24h with aNPs, we found a significant increase in Dendra-positive puncta in M17-WTsyn cells (**Fig. 2F**), indicating restoration of CMA activity. These results confirm that aNP-mediated re-acidification of defective lysosomes in M17-WTsyn cells promotes restoration of the ALP (i.e., improving α -syn degradation).

aNPs prevent α -syn-induced neuronal loss and synucleinopathy *in vivo*

We have recently shown that aNPs treatment is neuroprotective against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) intoxication in mice (Bourdenx et al., 2016). While the MPTP mouse is a widely used animal model of parkinsonism, it does not recapitulate the progressive dopaminergic neuronal loss and α -syn pathology concerning PD's natural progression. Therefore, we aimed to extend this observation and explore the translational potential of such an innovative strategy in a more clinically relevant model of PD related to α -syn-induced dopaminergic neurodegeneration. We thereby investigated this hypothesis via intracerebral injection of low doses (pg/ μ l) of α -syn containing LB extracts purified from the SNpc of PD brains, previously shown to promote α -syn pathology and progressive dopaminergic degeneration in wild-type mice and non-human primates (Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014).

To demonstrate the feasibility and therapeutic potential of this strategy in this PD mouse model, we next assessed at different time-points whether we were still able to detect Nile red-loaded aNPs within tyrosine hydroxylase (TH)-positive cells, a marker for dopaminergic neurons, without evident cytotoxicity at 24h, 48h, 1- and 4-month after intracerebral injection (**Fig. S3**). We further confirmed aNPs delivery into lysosomes of nigral dopaminergic cells *in vivo* by the co-presence of Nile red-loaded aNPs with lysosomal marker LAMP2 in TH-

positive cells at 24h, 48h, 1- and 4-month post-injection (**Fig. S3**). We injected LB-fractions into the SNpc of adult mice, concomitantly with aNPs or control NPs (vehicle solution was used as a control for LB-injection), and performed the full histopathological analysis 4-months after surgery (**Fig. 3A**). At 4 months post-injection, stereological cell counts of TH-positive neurons in mouse SNpc revealed that aNPs were able to reduce dopaminergic cell loss to 20%, instead of ~50% of α -syn-induced neurodegeneration typically observed in this model (Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014; F. N. Soria, Paviolo, Doudnikoff, Arotçarena, et al., 2020) (**Fig. 3B**). This was associated with an attenuation of TH-positive fibers loss in these animals at the striatal dopaminergic terminals (**Fig. S4A**).

Progressive neurodegeneration courses with mild neuroinflammation, and in our model, most glial reactivity takes place early after LB-injection (F. N. Soria, Paviolo, Doudnikoff, Arotçarena, et al., 2020). This prompted us to inject aNPs alongside LB instead of a later time-point since, in our experience, extensive glial activation occurs upon two consecutive intracerebral injections at the same site. At 4 months post-injection, we detected no increase in glial reactivity neither in the SNpc nor the striatum, as evidenced by comparable staining of astrocytic marker GFAP or microglia/macrophage protein Iba1 (**Fig. S4B-C**). This suggests that any neuroinflammation that might be triggered by LB+aNPs injection is resolved by the end of the experiment and shows that aNPs-induced neuroprotection is independent of neuroinflammatory processes.

We next explored whether the neuroprotection associated with aNPs treatment observed in the LB mouse model was also accompanied by a reduction in α -syn pathology. Total and proteinase K (PK)-resistant (i.e., aggregated) α -syn was seemingly decreased in the presence of aNPs, although the trend was not significant neither in the SNpc (**Fig. 3C**) nor in the striatum (**Fig. S4D**). Since our model is not based on viral vector-driven α -syn overexpression, and α -syn concentration in the inoculum is five orders of magnitude lower

than in other α -syn seeding models(Luk et al., 2012), PK-resistant aggregates are less common (F. N. Soria, Paviolo, Doudnikoff, Arotçarena, et al., 2020). Consequently, we performed immunohistochemical investigations in the SNpc with a phospho-specific Ser129 α -syn antibody as a second more sensitive readout of pathological α -syn (Fujiwara et al., 2002). Phospho-S129- α -syn levels were greatly increased in LB-injected mice compared to control, indicating the presence of toxic α -syn, and were almost completely restored to basal values by aNPs (**Fig. 3D**). These results suggest a dramatic reduction in α -syn-induced neurodegeneration and pathology through aNPs administration.

To gain mechanistic insight for the reduced α -syn pathology conveyed by aNPs treatment at 4 months post-injection, we assessed the effects of aNPs on injected human α -syn uptake at short term (24h, 48h) and middle term (1 month) after LB injection. We previously demonstrated that exogenously injected LB fractions containing human α -syn are internalized by TH-positive neurons within 24h (Recasens et al., 2014; F. N. Soria, Paviolo, Doudnikoff, Arotçarena, et al., 2020), and consequently induce the formation of *de novo* endogenous murine α -syn aggregates. Here, we found no difference in human α -syn-positive immunostaining present in nigral dopaminergic neurons of LB+aNPs mice compared to LB mice at 24h and 48h post-injection, suggesting that aNPs do not prevent the initial uptake of human- α -syn that triggers the endogenous pathological process (**Fig. S5A**). In agreement with previous observations in this model (Recasens et al., 2014; F. N. Soria, Paviolo, Doudnikoff, Arotçarena, et al., 2020), we did not find human- α -syn at 1-month post-injection in both groups (**Fig. S5A**). However, histological analysis of endogenous α -syn-positive immunostaining at 1-month post-injection revealed a significant decrease of total murine α -syn in the LB+aNPs group compared to the LB group, further suggesting that aNPs protect from endogenous α -synuclein accumulation even at one-month post-injection (**Fig. S5B**).

aNPs induce lysosomal recovery in dopaminergic neurons *in vivo*

Finally, we investigated whether aNPs are able to rescue α -syn-induced lysosomal dysfunction *in vivo* similarly to the *in vitro* results reported above. To this end, we examined the cellular distribution of lysosomal markers (LAMP2 and CatD puncta) and the occurrence of LMP (i.e., the cytosolic release of CatD and other hydrolases from the lysosomal lumen to the cytosol) in SNpc TH-positive neurons by confocal fluorescence microscopy and segmentation analysis at 4 months post-injection (**Fig. 4A**). We detected no changes in the number of lysosomes through LAMP2 (**Fig. 4B**) or CatD (**Fig. 4C**) puncta quantification, suggesting that neither LBs nor aNPs alter lysosomal biogenesis in these cells at 4-months. However, we observed a peak of LAMP2-positive puncta at 48h post-injection (**Fig. S5C-D**) while this effect was no longer present neither at 1- or 4-months post-injection. These results suggest that aNPs may enhance the lysosomal function in an early step, which lasts over time. By subtracting the fraction of CatD in colocalization with lysosomal marker LAMP2 (i.e., lysosomal CatD), we detected the increased cytosolic levels of CatD in LB-injected mice, which were entirely restored by aNPs (**Fig. 4D**). We further confirmed that CatD not colocalizing with LAMP2 belongs to the cytosolic compartment, as evidenced by the absence of co-staining with the endoplasmic reticulum marker PDI or the Golgi protein 58K (**Fig. S6**). This suggests that aNPs mitigate LMP, which is an indicator of sick lysosomes and has harmful effects on the cell (Boya & Kroemer, 2008).

Interestingly, it has been recently suggested that the subcellular localization of lysosomes determines their luminal pH, with peripheral lysosomes suffering from alkalinized pH and impaired proteolytic activity (Johnson, Ostrowski, Jaumouille, & Grinstein, 2016). Thus, we evaluated lysosomal positioning in nigral TH-positive neurons *in vivo* by segmentation analysis of confocal images at 4 months post-injection. Following cell

segmentation into nuclear and cytoplasmic regions-of-interests (ROIs) and detection of LAMP2-positive vesicles, we calculated the distance of each LAMP2-positive lysosome to the nucleus border (**Fig. 4E**). Strikingly, dopaminergic neurons in SNpc of LB+aNPs mice displayed lysosomes that were closer to the nucleus than in the LB group (**Fig. 4F**), in agreement with recent *in vitro* studies (Johnson et al., 2016), and indirectly suggesting that a higher amount of lysosomes from aNPs-treated LB mice presented acidic pH. Since lysosomal redistribution is a protective cellular mechanism used by the cell to cope with stress (Korolchuk et al., 2011), we hypothesize that the perinuclear localization of aNPs-treated lysosomes would be a sign of overall cellular health.

Altogether, our results suggest that aNPs treatment *in vivo* is efficient to restore proper lysosomal function and integrity in nigral dopaminergic neurons of LB-injected animals.

DISCUSSION

Here, we first confirmed that aNPs were able to restore proper lysosomal function and integrity through re-acidification of the lysosomal lumen in wild-type α -syn overexpressing cells. We further showed, *in vitro*, that ALP-mediated α -syn degradation is enhanced through the restoration of lysosomal function induced by aNPs treatment. Remarkably, aNPs also restored *in vivo* lysosomal function, reduced α -syn pathology, and ultimately protected dopaminergic neurons from α -syn-induced cell death in LB-injected mice. Both in PD and synucleinopathy models based on α -syn injection, it has been proposed that aggregated α -syn transmits its misfolded conformation by recruiting α -syn monomers (i.e. “seeding”) in a prion-like manner, spreading pathology through neuroanatomically connected regions (Jucker & Walker, 2013). In our particular model, exogenously injected toxic α -syn (from a human

origin) is internalized by TH-positive SNpc neurons within 24h and 48h post-injection (Recasens et al., 2014; F. N. Soria, Paviolo, Doudnikoff, Arotçarena, et al., 2020), since subsequent *de novo* aggregates containing mostly endogenous (rodent) protein are produced. Since aNPs are found in the brain long after intraparenchymal injection (Bourdenx et al., 2016; Prevot et al., 2018), they likely boost degradation of endogenous, *de novo* aggregated, α -syn rather than human α -syn seeds. This is supported by the observation of decreased levels of endogenous α -syn found in the LB+aNPs treated mice after 1-month, and by the observation that aNP-mediated decrease in phospho-S129- α -syn at 4 months, which labels neurotoxic α -syn before oligomerization (Chen & Feany, 2005), is more significant than the amelioration on PK-resistant α -syn labeling, which is a marker of dense aggregates.

We also demonstrated that aNP-mediated restoration of lysosomal activity in surviving TH neurons is a long-term effect, present at 4-months post-injection. The strong influence on neurodegeneration would then be associated with increased partially α -syn degradation and with the promotion of overall cellular health by improving protein clearance. This is supported by the decreased LMP process as well as an increased number of lysosomes relocalized to the perinuclear area observed in aNPs-treated animals that indirectly illustrate a specific restoration of proper lysosomal function through re-acidification. Even though both LBs and aNPs might be internalized by glial cells in the vicinity or by other neurons present in the SNpc, this lysosome-boosting effect would be particularly beneficial to aged dopaminergic neurons, whose degradation systems are overstrained by higher metabolic demand and elevated oxidative stress (Trist, Hare, & Double, 2019). Furthermore, given that approximately 50% of TH-positive neurons are lost after LB injection (compared to 20% in

the LB+aNPs group), our observations on lysosomal health in these mice are likely underestimated since we have no data from dead neurons. Thus, the overall difference in lysosomal health (i.e., both LMP and lysosomal localization) between LB and LB+aNPs groups might be even more significant. Future developments of tools aimed to monitor lysosomes *in vivo* and in real-time, plausibly by live imaging, will help to clarify this question.

In the context of neurodegenerative diseases associated with protein aggregation, such as PD, Alzheimer's disease, or Amyotrophic lateral sclerosis, lysosomes are critical organelles essential for the clearance of amyloidogenic proteins. Thus, treatments aimed at improving lysosomal function, such as the method we present here, might prove useful for proteinopathies other than PD or lysosomal-storage disorders. A similar approach recently used graphene nanoparticles to tackle the problem by impeding α -syn fibrilization and disassembling aggregates, with comparable successful results regarding dopaminergic cell loss (Kim et al., 2018). pH-responsive nanoparticles have also been used to target acidic organelles to treat chronic pain in rodents (Ramirez-Garcia et al., 2019). Because of their organic nature, all these nanoparticles can potentially be tailored for delivery to specific cell types through chemical conjugation. Moreover, we have recently demonstrated that aNPs can be loaded into oil-in-water nanoemulsions to facilitate the crossing of the blood-brain barrier and therefore enable systemic delivery (Prevot et al., 2018). Then, nanoparticle-based approaches emerge as a therapeutic opportunity that would allow to address the origin of PD and similar proteinopathies rather than mitigate its effects (Cunha et al., 2021).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation of acidic nanoparticles

The protocol was adapted from our previous study (Bourdenx et al., 2016). Acidic nanoparticles (aNPs) solutions were freshly prepared using the nanoprecipitation method. Briefly, 31 mg of Resomer® RG 503H PLGA (Sigma-Aldrich, 719870) and 1.0 mg of Nile Red (Sigma-Aldrich, 19123) were dissolved in 3.1 mL of tetrahydrofuran (THF, Sigma-Aldrich, 401757). 200 μ L of this stock solution was quickly added to 20 mL of deionized water under sonication (10 W, 3 min). The resulting clear pink solution was then slowly concentrated by centrifugation using 10 kDa centrifugal filters (Merck Millipore, Amicon Ultra centrifugal Filter) for 21 min. at 5 000 RPM (Centrifuge 5804 R, Eppendorf). Once the supernatant was collected, the resulting dark pink solutions were ready for use (typical concentration of PLGA \sim 1 mg/ml). As control conditions, Fluorescent Organic Nanoparticles (NPs) were prepared following a similar procedure; 0.4 mg of hydrophobic Nile Red dye (Daniel et al., 2016) was dissolved in 1 mL of THF, then 200 μ L of the resulting stock solution was added to 20 mL of deionized water under sonication (10 W, 3 min.). The resulting red solutions are used without any further purification.

Physical characteristics of these NPs were assessed by DLS, Zetameter, and TEM. The hydrodynamic size of the NPs was measured using a DLS device from Malvern Instruments (Zetasizer Nano ZS). NPs were diluted at 1:1000 (v/v) and the mean size was determined on 3 independent measurements performed at 25°C. Zeta potential measurement was performed using Zetasizer Nano ZS coupled with Folded Capillary Cell (DTS1060) from Malvern Instruments. aNPs were then characterized using TEM, which was carried out using a HITACHI H7650 (HITACHI Ltd., Tokyo, Japon) electron microscope at 80 kV and a TALOS F200S (ThermoFisher Talos) electron microscope at 190 kV. Briefly, the copper grid

coated with a carbon membrane was pretreated using the Glow discharge technique to yield a positively charged hydrophilic carbon surface to allow stronger interaction between the sample and the grid itself and thus easier imaging. One droplet of the nanoparticles (aNPs or NPs) aqueous suspension was deposited on the grid, and the excess liquid was dried off with a paper. A staining procedure using uranyl acetate was used to enhance the contrast. The nanoparticles were randomly and manually counted using the ImageJ program (using a circle selection).

Cell lines and cell viability assay

Human neuroblastoma cell line, BE (2)-M17, obtained from ATCC (catalog CRL-2267), were maintained at 37°C in 5% CO₂ in OPTIMEM (Thermo Fisher Scientific) plus 10% FBS supplemented with 1% streptomycin/penicillin (Millipore Sigma). Human neuroblastoma cell line, BE (2)-M17, obtained from ATCC (catalog CRL-2267) and stably transfected with WT alpha-synuclein (M17-WTsyn) were maintained at 37°C in 5% CO₂ in OPTIMEM (Thermo Fisher Scientific) plus 10% FBS supplemented with 1% streptomycin/penicillin (MilliporeSigma) and 1% geneticin (G418) (Thermo Fischer Scientific). To assess cell viability, M17 and M17-WTsyn cell lines were plated in 96-wells plate and treated with non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) for 24 hours at 1:1 000. Cell viability was then estimated by an MTT assay (ATCC, 30-1010K) following the manufacturer's recommendations.

Lysosomal uptake of aNPs

To confirm the delivery of aNPs to lysosomes, M17 and M17-WTsyn cell lines were plated on coverslips in a 12-well plate. Transient transfection experiment with LAMP1-GFP was performed with Lipofectamine 2000 (Life Technologies, 11668019) following the

manufacturer's recommendations. Cells were maintained for 24 hours at 37°C in 5% CO₂ before being treated with Nile red-loaded aNPs for 24 hours at 1:1 000. Cells coverslips were fixed at 4°C for 20 minutes using 4% paraformaldehyde. The fixed cells were washed 3 times with PBS1X for 5 minutes each time. Cells coverslips were permeabilized for 5 minutes into PBS-Saponine 0.02%, blocked in 4% goat serum/PBS for 1 hour at RT and incubated overnight at 4°C with mouse anti-LAMP2 (SantaCruz, sc18822, 1:1 000). Following incubation with primary antibody, cell coverslip were washed with PBS 3 times and incubated for 1 hour at RT with a corresponding goat anti-mouse IgG conjugated to AlexaFluor probe (Invitrogen, 1: 400). Coverslips were finally stained with DAPI solution (Invitrogen) at 10 µM for 8 minutes before long washes in PBS1X and mounted onto slides using a mounting solution (Dako). Image acquisitions were made on a wide-field Olympus Epifluorescent Microscope (BX3-CBH) coupled with a Hamamatsu camera (ORCA-Flash 4.0 LT). Images were deconvolved using the cellSens Dimension software. Confocal images were obtained in a Leica TCS SP8 microscope. Image stacks (pixel size ~100 nm, z-step 0.3 µm) were acquired with an 63× Plan Apo CS objective with oil immersion. Colocalization, fluorescence profiles, orthogonal projections, and maximal intensity projections were obtained with the ImageJ (NIH) distribution Fiji.

Lysosomal pH measurement

Quantification of lysosomal pH was determined using dextran conjugates LysoSensor Yellow/Blue DND-160 (Life Technologies) and was performed as previously described (Dehay et al., 2012). Briefly, M17 and M17-WTsyn cell lines were grown in their respective media. Cells were then trypsinized, harvested (1 X 10⁶ cells/mL), and loaded with 1 mg/mL of LysoSensor-dextran for 1 h at 37 °C with 5% CO₂. The cells were then washed 3W in HBSS (Gibco, 14060) and aliquoted at 100 mL into a black 96-well microplate. pH

calibration was performed as previously described (Dehay et al., 2012). M17 and M17-WTsyn cells were treated with 10 mM monensin (Sigma-Aldrich) and 10 mM nigericin (Sigma-Aldrich) in MES buffer (5 mM NaCl, 115 mM KCl, 1.3 mM MgSO₄, 25 mM MES), with the pH adjusted to a range from 3.5 to 7.0. The samples were read in a FLUOstar Optima fluorimeter (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France) with excitation at 355 nm. The ratio of emission 440/535 nm was then calculated for each sample. The pH values were determined from the standard linear curve generated via the pH calibration samples.

CTSD, HEX/ β -hexosaminidase, and ACP2 activity assay

The integrity of the lysosomal membrane in cultured cells was monitored by analyzing the presence of three lysosomal enzymes, namely, cathepsin D, HEX/ β -hexosaminidase, and acid phosphatase in the cytosol. M17 and M17-WTsyn cell lines were plated in 12-wells plate and treated with non-acidic (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) for 24 hours at 1:1 000. CTSD activity was measured using a fluorometric CTSD activity assay kit (Abcam, ab65302) in accordance with the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured on a FLUOstar Optima microplate analyzer (BMG Labtech). Phosphatase activity was assayed with the help of the acid phosphatase assay kit (CS0740; Sigma), according to the manufacturer's instructions, as well as the β -hexosaminidase assay kit (CS0780; Sigma). To measure the cytosolic cathepsin D, acid phosphatase, and β -hexosaminidase activity, cells were rinsed extensively with ice-cold PBS and then removed by trypsinization in the homogenization buffer. The lysosomal fraction was isolated by differential sedimentation in sucrose homogenization buffer (0.25 M sucrose, 20 mM Hepes) as described in (Dehay et al., 2012). The cytosolic fractions were prepared by centrifugation of the supernatant of the light mitochondrial-lysosomal fraction at 100,000 x g for 30 min, as extensively described in (Dehay et al., 2012). Prewarmed (37 °C) substrate solution and reaction components were

mixed in a 96-well plate. Briefly, the β -hexosaminidase activity was determined by the addition of 90 μ L of assay buffer [0.09 M citrate buffer (pH4.8); 1 mM 4-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide] to 10 μ L of cell lysates. The acid phosphatase activity was determined by the addition of 50 μ L of assay buffer [0.09 M citrate buffer (pH 4.8); 1 mM 4-nitrophenyl phosphate] to 50 μ L of cell lysates. For both assays, the reaction mixture was incubated at 37 °C for 10 min and stopped by the addition of 200 μ L of stop solution (0.5 N of NaOH). The absorbance was measured at 405 nm. CTSD activity was measured with 50 μ l of samples and was incubated with reaction buffer supplied in the kit for 1 h at 37 °C according to manufacturer's protocol. Fluorescence was measured (Ex/Em = 328/460 nm). Fold increases in protease activity were determined by comparing the relative fluorescence units (RFUs) against the levels of the controls. CTSD, acid phosphatase, and β -hexosaminidase activity were measured in triplicate. We normalized the activity of lysosomal proteases by correcting the activity in the cytosol toward the activity in the lysosomal fractions.

Tandem fluorescent reporter mCherry-GFP-LC3 assay

To assess autophagy flux, the mCherry-GFP-LC3 probe was used as previously described (Castillo, Valenzuela, Onate, & Hetz, 2017). Briefly, M17 and M17-WTsyn cell lines were plated on coverslips in 12-wells plate and were transfected with mCherry-GFP-LC3 plasmid at 1.6 μ g DNA using PEI-mediated transfection. Cells were maintained for 24 hours at 37°C in 5% CO₂ before being treated with non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) for 24 hours at 1:1,000. Cells coverslips were fixed at 4°C for 20minutes using 4% paraformaldehyde. The fixed cells were washed 3 times with PBS1X for 5 minutes each time. Cells coverslips were finally stained with DAPI solution (Invitrogen) at 10 μ M for 8 minutes before long washes in PBS1X. Coverslips were mounted onto slides using a mounting

solution (Dako), and image acquisitions were made on a wide-field Olympus Epifluorescent Microscope (BX3-CBH) coupled with a Hamamatsu camera (ORCA-Flash 4.0 LT). Images were deconvolved using the cellSens Dimension software. Image analysis was performed in FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012) using custom scripts (available upon request). For mCherry analysis, cells were segmented by manual cell selection. The mask was then applied to the mCherry channel, where red staining was quantified by automatic thresholding followed by binarization. Total staining was normalized per cell. A minimum of 20 cells was analyzed for each condition. Co-localization was obtained from binary images of mCherry and GFP channels with the ImageCalculator plugin (function “AND”) and expressed as Yellow dots (autophagosome). Red dots correspond to the subtraction between Yellow dots and total mCherry staining (autophagolysosome).

Lysosomal galectin puncta assay

To assess the lysosomal galectin puncta assay, the mCherry-LGALS3/galectin-3 plasmid (kindly provided by Harald Wodrich’s lab) was used as previously described (Aits et al., 2015). Briefly, M17 and M17-WTsyn cell lines were plated on coverslips in 12-wells plate and were transfected with mCherry-LGALS3/galectin-3 plasmid at 1.6 μ g DNA using PEI-mediated transfection. Cells were maintained for 24 hours at 37°C in 5% CO₂ before being treated with non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) for 24 hours at 1:1 000. Cells coverslips were fixed at 4°C for 20minutes using 4% paraformaldehyde. The fixed cells were washed 3 times with PBS1X for 5 minutes each time. Cells coverslips were finally stained with DAPI solution (Invitrogen) at 10 μ M for 8 minutes before long washes in PBS1X. Coverslips were mounted onto slides using a mounting solution (Dako), and image acquisitions were made on a wide-field Olympus Epifluorescent Microscope (BX3-CBH) coupled with a Hamamatsu camera (ORCA-Flash 4.0 LT). Images were deconvolved using

the cellSens Dimension software. Image analysis was performed in FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012). For mCherry analysis, cells were segmented by manual cell selection. The mask was then applied to the mCherry channel, where red staining was quantified by automatic thresholding followed by binarization. Total staining was normalized per cell, and a minimum of 20 cells was analyzed for each condition.

Assessment of CMA activity

To assess the CMA activity, a lentivirus expressing the photoactivable CMA-specific fluorescent substrate KFERQ-PS-Dendra was used as previously described (Koga et al., 2011). Briefly, M17 and M17-WTsyn cell lines were plated on coverslips in a 12-wells plate and were infected with 0.5mL of lentivirus supernatant (kindly provided by Ana María Cuervo's lab) using polybrene mediated infection for 48 hours. Then, photoconversion of cells grown on coverslips was carried out with a 405/20 nm LED array for 3 min. Cells were then treated with non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) at 1:1 000 and maintained for 24 hours at 37°C in 5% CO₂. Cells coverslips were fixed at 4°C for 20minutes using 4% paraformaldehyde. The fixed cells were washed 3 times with PBS1X for 5 minutes each time. Cells coverslips were finally stained with DAPI solution (Invitrogen) at 10 µM for 8 minutes before long washes in PBS1X. Coverslips were mounted onto slides using a mounting solution (Dako), and image acquisitions were made on a wide-field Olympus Epifluorescent Microscope (BX3-CBH) coupled with a Hamamatsu camera (ORCA-Flash 4.0 LT). Images were deconvolved using the cellSens Dimension software. Image analysis was performed in FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012). For red-Dendra analysis, cells were segmented by manual cell selection. The mask was then applied to the red channel, where red staining was quantified by automatic thresholding followed by binarization. Total staining was normalized per cell, and a minimum of 20 cells was analyzed for each condition.

***In vitro* immunoblotting assessment**

M17 and M17-WTsyn cell lines were plated in 12-wells plate and treated with non-acidic (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) for 24 hours at 1:1 000. For the Bafilomycin A1 experiment, cells were co-treated with 500nM of BafilomycinA1 (Sigma) for 1 hour at the last hour of NPs/aNPs treatment. Cells were washed and resuspended with cold phosphate-buffered saline at 4°C and transferred to Eppendorf tubes. After a centrifugation step at 1300g for 5 minutes, the supernatant was removed, and the cell pellet was lysed in 100 µl of Laemmli buffer (Tris-HCl 25 mM, pH 6.8, glycerol 7.5%, SDS 1%, DTT 250 mM, and Bromophenol blue 0.05%). Western blots were run from 20µl cell lysates separated by SDS-PAGE and transferred to 0.2µm nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Incubation of primary antibodies was performed overnight at 4°C with mouse anti- α -synuclein (1:1,000, clone syn211, Thermo Scientific, MS1572), mouse anti-MEF2D (1:1,000; BD Transduction Laboratories, 610774), mouse anti-GADPH (1:1,000, clone 6C5, Abcam, 8245), rabbit anti-LC3 (1:1,000, Novus Biologicals, 100-2220), rabbit anti-LAMP2A (1:1,000, Abcam, 18528), rat anti-Hsc70 (1:1,000, clone 1B5, Enzo Life Sciences, ADI-SPA-815). Mouse anti-actin (1:2,000, Millipore Sigma, A5441) was used to control equal loading. Appropriate secondary antibodies coupled to peroxidase were revealed using a Super Signal West Pico Chemiluminescent kit (Immobilon Western, Chemiluminescent HRP substrate, Millipore Sigma). Chemiluminescence images were acquired using the ChemiDoc+XRS system measurement (Bio-Rad). Signals per lane were quantified using ImageJ, and a ratio of the signal on loading per sample was performed and used in statistical analyses.

Purification of Lewy bodies from human Parkinson's disease brains

Human SNpc was dissected from fresh frozen post-mortem midbrain samples from 3 patients with sporadic Parkinson's Disease exhibiting conspicuous nigral LB pathology on neuropathological examination (mean age at death: 76 ± 2.2 years; frozen post-mortem interval: 29.5 ± 4.91 h; GIE Neuro-CEB BB-0033-00011). Tissue was homogenized in 9 vol (w/v) ice-cold MSE buffer (10 mM MOPS/KOH, pH 7.4, 1M sucrose, 1mM EGTA, and 1mM EDTA) with protease inhibitor cocktail (Complete Mini; Boehringer Mannheim) with 12 strokes of a motor-driven glass/Teflon homogenizer. For LB purification, a sucrose step gradient was prepared by overlaying 2.2 M with 1.4 M and finally with 1.2 M sucrose in volume ratios of 3.5:8:8 (v/v). The homogenate was layered on the gradient and centrifuged at $160,000 \times g$ for 3 h using a SW32.1 rotor (Beckman). Twenty-six fractions of 1500 μ l were collected from each gradient from the top (fraction 1) to bottom (fraction 26) and analyzed for the presence of α -synuclein aggregates by filter retardation assay, as previously described (Recasens et al., 2014). Further characterization of LB fractions was performed by immunofluorescence, α -synuclein ELISA quantification, and electron microscopy as previously described (Bourdenx et al., 2020). For stereotactic injections, LB-containing fractions from Parkinson's disease patients were mixed together in the same proportion (PD #1, fractions 19, 20, and 21; PD #2, fractions 19 and 20; PD #3, fraction 22). The amount of α -syn in the LB fractions was quantified by human α -syn ELISA kit (#KHB0061; Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), corresponding to ~ 24 pg α -synuclein per microliter of injected sample. In all cases, samples were bath-sonicated for 5 min prior to *in vivo* injections.

Animals and surgical procedures

Forty-eight wild-type C57Bl/6J male mice (9 weeks old) (Charles River) received either 2 μ L of either LB fractions or Vehicle (i.e., sucrose 2,2M), supplemented with 1 μ L of either non-

acidic (NP) or acidic nanoparticles (aNPs) by stereotactic delivery to the region immediately above the right SN (coordinates from bregma: AP: -2.9; L: 1,3; DV: -4.5) at a flow rate of 0.4 μ l/min with a 30-gauge Hamilton syringe coupled to a microinjection pump (World Precision Instruments). The pipette was left in place for 8 minutes after injection to avoid leakage. Animals were terminated after 24h [Veh+aNPs: n=2; LB+NPs: n= 2; LB+aNPs:n=2], 48h [Veh+aNPs: n=2; LB+NPs: n= 2; LB+aNPs:n=2], 1 month [Veh+aNPs: n=3; LB+NPs: n= 3; LB+aNPs:n=3] and 4 months [Veh+NPs: n=5; Veh+aNPs: n=6; LB+NPs: n=8; LB+aNPs:n=8]. The animals from the Veh+aNPs group received NileRed-loaded aNPs to follow the nanoparticles, whereas the other groups received clear aNPs for the need of future immunofluorescence co-staining. Animals were perfused using saline solution followed by 4% paraformaldehyde fixation. Brains were then collected, immediately immersed in cold 4% paraformaldehyde for 24 h, then cryoprotected with 20% sucrose, and finally frozen by immersion in isopentane at -60°C before sectioning at 40 μ m thickness.

Histopathological analysis

To assess the integrity of the nigrostriatal pathway, TH immunohistochemistry was performed on SNpc and striatal sections. Briefly, free-floating sections from 3 representative levels of the striatum (anterior, medial, and posterior) and serial sections (1 of 4) corresponding to the whole SNpc were incubated with a rabbit monoclonal antibody raised against mouse TH (Abcam, EP1532Y, ab137869, 1:5,000) for 1 night at room temperature and revealed with anti-rabbit peroxidase EnVision® system (DAKO, K400311) followed by DAB visualization. Sections were mounted on gelatinized slides, counterstained with 0.1% cresyl violet solution, dehydrated, and cover-slipped, while striatal sections were mounted on gelatinized slides and cover-slipped. The extent of the lesion in the striatum was quantified by optical density (OD). Sections were scanned in an Epson expression 10000XL high-resolution scanner, and images

were used in ImageJ open-source software to compare the gray level in the putamen. TH-positive SNpc cells were counted by stereology, blind with regard to the experimental condition, using a Leica DM6000B motorized microscope coupled with the Mercator software (Explora Nova). The SN was delineated for each slide, and probes for stereological counting were applied to the map obtained. Each TH-positive cell with its nucleus included in the probe was counted. The optical fractionator method was finally used to estimate the total number of TH-positive cells in the SNpc of each mouse hemisphere.

Synucleinopathy was assessed with a mouse monoclonal antibody raised against total α -synuclein (BD Transduction Laboratories, clone 42, #610787, 1:1,000) and against phosphorylated α -synuclein (Abcam, EP1536Y, ab51253, 1:5,000), as previously reported (Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014). Briefly, selected sections of one rostrocaudal level of SN and striatum were explicitly identified and incubated in the same well to allow direct comparison of immunostaining intensity. For pretreatment with proteinase K (PK), sections were incubated first with PK at 1 μ g/ml in PBS for 10 minutes at room temperature before long sequential washes in distilled water and then in PBS. Sections were incubated overnight at room temperature with the aforementioned antibodies. The revelation was performed as described for TH staining. We measured the area of total α -synuclein staining in SN and striatum with and without PK pretreatment to fully characterize the pattern of synucleinopathy. High-resolution whole color slide images were acquired with a 3D Hitech Panoramic Scanner at the 20 \times magnification, with 5 layers in extended mode. Each image was opened in Mercator Pro 7.12.3 software (Explora Nova), and all regions of interest were mapped. Brightness and contrast rules were applied to the RGB pictures to optimize details without any saturation of the image. The color thresholding tool was then used to select the threshold corresponding to the brown color revealed by the DAB staining. The threshold has been established on the basis of the staining intensity to detect the maximum of

DAB staining. These parameters were applied to all measurements for each animal/staining. The area corresponding to the threshold defined was expressed as a ratio of the total area of each region of interest (ROI), normalized by the contralateral side for each animal and expressed as a percentage of the control group. In addition, phosphorylated α -synuclein-positive dots in SN were counted by stereology, similarly as with TH-positive neurons. The optical fractionator method estimated the total number of phosphorylated α -synuclein-positive dots per μm^2 in the SN of each mouse.

At 1-month post-injection, induction of endogenous synucleinopathy was assessed in the SNpc using a specific rabbit monoclonal antibody raised against murine α -synuclein (1:1,000, clone D37A6, CST, 4179S). The immunohistochemical protocol was performed as described for TH staining. The level of α -synuclein-positive staining was quantified by optical density (OD).

Inflammation was measured with GFAP/S-100 (DAKO, Z0334/Abnova, PAP11341) and Iba1 (Abcam, ab5076) antibodies. Nigral and striatal sections of all animals were incubated together overnight with a mix of rabbit antibodies raised against GFAP and S-100 for the astroglial staining (respective dilutions 1:2,000 and 1:1,000) and with a rabbit anti-Iba1 antibody for the microglial staining (dilution 1:1,000) and revealed and processed as described above. GFAP-positive astrocytic reaction or Iba1-positive microglial reaction was estimated by area quantification at regional levels with Mercator Pro software (Explora Nova).

Immunofluorescence and image analysis

Tissue sections were permeabilized for 1 hour in 4% donkey or goat serum/PBS blocking buffer containing 0.2% Saponine (Millipore Sigma) and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in a 1% donkey or goat serum/PBS buffer depending on

the different needed combinations: rabbit anti-TH (Abcam, EP1532Y, ab137869, 1:2,000), mouse anti-TH (Merck, clone LNC1, MAB318, 1:2,000), goat anti-TH (Novus Biologicals, NB300-110, 1:2,000), rabbit anti-CatD (Abcam, EPR3057Y, ab75852, 1:1,000), rat anti-LAMP2 (Abcam, Ab193, ab25339, 1:1,000), mouse anti-human α -synuclein (ThermoFisher Scientific, Syn211, 32-8100, 1:1,000), goat anti-58K Golgi protein (Abcam, ab19072, 1:1,000), mouse anti-PDI (Enzo LifeSciences, clone 1D3, ADI-SPA-891, 1:1,000). Tissue sections were washed in PBS and incubated for 2 hours at room temperature with a combination of a corresponding donkey or goat anti-species IgG conjugated with Alexa Fluor 488 and 594 (Invitrogen) or Atto647N (Merck). Sections were washed with PBS and mounted in DAPI-containing mounting media (Vectashield).

For illustrative images at 24h, 48h, 1- and 4-month post-injection, image acquisitions were made on a wide-field Olympus Epifluorescent Microscope (BX3-CBH) coupled with a Hamamatsu camera (ORCA-Flash 4.0 LT). Images were deconvolved using the cellSens Dimension software. For LAMP2 count and analysis in TH-positive cells at 24h, 48h, and 1-month post-injection, image analysis was performed in FIJI/ImageJ. Cells were segmented by manual cell selection using the TH channel. The mask was then applied to the LAMP2 channel, where LAMP2 staining was quantified by automatic thresholding followed by binarization. Total staining was then normalized per cell.

For quantitative analysis at 4-month post-injection, images (pixel size = 80 nm) were acquired in sequential mode (to minimize channel crosstalk), with a 63X Plan Apo CS objective with oil immersion (numerical aperture = 1.4) in a Leica TCS SP8 confocal microscope. Image analysis was performed in FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012) using custom scripts (available at https://github.com/SoriaFN/Lysosome_analysis (Federico N. Soria, 2021)). For LAMP2/CatD analysis, 3-channel (TH/LAMP2/CatD) confocal images (pixel size = 80 nm) were denoised by difference of Gaussians (DoG) and segmented in the

TH channel by manual thresholding. The TH channel-based mask was then applied to LAMP2 and CatD channels, where lysosomal and CatD puncta were quantified by automatic thresholding followed by binarization (puncta smaller than 10 px were discarded). Total LAMP2 and CatD puncta were normalized per cell, and 10-20 cells were analyzed per animal. Colocalization was obtained from LAMP2 and CatD binary images with the ImageCalculator plugin (function “AND”). To estimate cytosolic CatD, LAMP2/CatD-positive puncta was subtracted from total CatD to determine non-lysosomal CatD fraction. For lysosomal distance analysis, cytoplasmic and nuclear ROIs were manually segmented using the TH channel of single z-planes where the nucleus was clearly visible. To prevent a bias due to low cytoplasmic area and to ensure that the comparisons were made between cells with similar cytoplasmic ROIs, the analysis was subsequently performed only in cells where the ratio of cytoplasmic to nuclear ROI area was 2:1. Lysosomal puncta were segmented from the LAMP2 channel, and the distance from the nucleus center to the center of mass of each lysosomal ROI was calculated. Finally, to estimate the distance to the nucleus border, the average radius of an ellipse fitted to the nuclear ROI was subtracted from the distance to the nucleus center.

Statistics

Statistical analyses were performed with Prism 8 (GraphPad). Comparisons among means were performed by using Two-way ANOVA followed, if appropriate, by pairwise comparison between means by Tukey post hoc analysis. For analysis of lysosomal distance to the nucleus, Mann-Whitney test comparing ranks was performed. All values are expressed as the mean \pm SEM unless specified otherwise in the figure legend. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Study approval

Animals. Experiments were performed in accordance with the European Union directive of September 22, 2010 (2010/63/EU), on the protection of animals used for scientific purposes. The Institutional Animal Care and Ethical Committee of Bordeaux University (CE50, France) approved experiments accepted by the ministry under references APAFIS#8876–2016121452125 and APAFIS#24160.

Human tissues. The samples were obtained from brains collected in a Brain Donation Program of the Brain Bank “GIE NeuroCEB” run by a consortium of Patients Associations: ARSEP (association for research on multiple sclerosis), CSC (cerebellar ataxias), France Alzheimer, and France Parkinson. The consent documents were signed by the patients themselves or their next of kin in their name, in accordance with the French Bioethical Laws. The Brain Bank GIE NeuroCEB (Bioresource Research Impact Factor number BB-0033-00011) has been declared at the Ministry of Higher Education and Research and has received approval to distribute samples (agreement AC-2013-1887).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Mathieu Bourdenx for helpful discussions and comments on the manuscript. We thank Guillaume Dabée, Melissa Deshors, and Elisabeth Normand for animal care, and Marie-Laure Thiolat for technical assistance. We thank Dr. Ana Maria Cuervo for the generous gift of KFERQ-PS-Dendra lentiviral particles. We thank Dr. Harald Wodrich (MPF CNRS UMR 5234, Bordeaux, France) for mCherry-Gal3 construct. The LABEX Brain (ANR-10-LABX-43), the University of Bordeaux, and the Centre National de la Recherche Scientifique provided infrastructural support. This work was supported by Fondation de France Grant number 00066525 and an IDEX Emergence Grant number OPE-2018-410 (BD). FNS acknowledges funding from the Spanish Ministry of Science and Innovation (IJC1-2017-

32114). A.C. is a recipient of an MSER fellowship (France). GP has been supported by a Fondation de France fellowship. MLA is a recipient of a France Parkinson fellowship (France). The help of the Bordeaux Imaging Center-part of the national infrastructure France BioImaging, granted by ANR-10INBS-04-0, is acknowledged. Animal experiments were performed at the Animal Facilities of the University of Bordeaux, supported by the Région Nouvelle-Aquitaine. The human samples were obtained from the Brain Bank GIE NeuroCEB (BRIF number 0033-00011), funded by France Alzheimer, France Parkinson, ARSEP, and Connaître les Syndromes Cérébelleux, to which we express our gratitude.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

E.B. owns equity stake in Motac Holding Ltd. and receives consultancy payments from Motac Neuroscience Ltd. All other authors declare no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTION

BD isolated LB fractions, AC and JD prepared NPs and aNPs. FNS and MLA performed surgeries. MLA, FNS, ED, and GP performed histopathological analysis. MLA and BD carried out cell culture assays. FNS and MLA prepared the figures. FNS, MLA and BD wrote the paper with input from all authors. BD, SC-M, FNS and GP conceptualized the study and designed experiments. MB-D, PB, EB, SC-M and BD secured funding.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

REFERENCES

- Aits, S., Krickler, J., Liu, B., Ellegaard, A.-M., Hämälistö, S., Tvingsholm, S., . . . Jäättelä, M. (2015). Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. *Autophagy*, *11*(8), 1408-1424. doi:10.1080/15548627.2015.1063871
- Aniento, F., Roche, E., Cuervo, A. M., & Knecht, E. (1993). Uptake and degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by rat liver lysosomes. *J Biol Chem*, *268*(14), 10463-10470.
- Arotcarena, M. L., Teil, M., & Dehay, B. (2019). Autophagy in Synucleinopathy: The Overwhelmed and Defective Machinery. *Cells*, *8*(6). doi:10.3390/cells8060565
- Bagh, M. B., Peng, S., Chandra, G., Zhang, Z., Singh, S. P., Pattabiraman, N., . . . Mukherjee, A. B. (2017). Misrouting of v-ATPase subunit V0a1 dysregulates lysosomal acidification in a neurodegenerative lysosomal storage disease model. *Nat Commun*, *8*, 14612. doi:10.1038/ncomms14612
- Baltazar, G. C., Guha, S., Lu, W., Lim, J., Boesze-Battaglia, K., Laties, A. M., . . . Mitchell, C. H. (2012). Acidic nanoparticles are trafficked to lysosomes and restore an acidic lysosomal pH and degradative function to compromised ARPE-19 cells. *PLoS One*, *7*(12), e49635. doi:10.1371/journal.pone.0049635
- Bennett, M. C., Bishop, J. F., Leng, Y., Chock, P. B., Chase, T. N., & Mouradian, M. M. (1999). Degradation of alpha-synuclein by proteasome. *J Biol Chem*, *274*(48), 33855-33858. doi:10.1074/jbc.274.48.33855
- Bisaglia, M., Greggio, E., Maric, D., Miller, D. W., Cookson, M. R., & Bubacco, L. (2010). Alpha-synuclein overexpression increases dopamine toxicity in BE2-M17 cells. *BMC Neurosci*, *11*, 41. doi:10.1186/1471-2202-11-41
- Bourdenx, M., Daniel, J., Genin, E., Soria, F. N., Blanchard-Desce, M., Bezdard, E., & Dehay, B. (2016). Nanoparticles restore lysosomal acidification defects: Implications for Parkinson and other lysosomal-related diseases. *Autophagy*, *12*(3), 472-483. doi:10.1080/15548627.2015.1136769
- Bourdenx, M., Nioche, A., Dovero, S., Arotcarena, M. L., Camus, S., Porras, G., . . . Bezdard, E. (2020). Identification of distinct pathological signatures induced by patient-derived

- alpha-synuclein structures in nonhuman primates. *Sci Adv*, *6*(20), eaaz9165. doi:10.1126/sciadv.aaz9165
- Boya, P., & Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, *27*(50), 6434-6451. doi:10.1038/onc.2008.310
- Castillo, K., Valenzuela, V., Matus, S., Nassif, M., Oñate, M., Fuentealba, Y., . . . Hetz, C. (2013). Measurement of autophagy flux in the nervous system in vivo. *Cell Death Dis*, *4*(11), e917. doi:10.1038/cddis.2013.421
- Castillo, K., Valenzuela, V., Onate, M., & Hetz, C. (2017). A Molecular Reporter for Monitoring Autophagic Flux in Nervous System In Vivo. *Methods Enzymol*, *588*, 109-131. doi:10.1016/bs.mie.2016.09.077
- Chen, L., & Feany, M. B. (2005). Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease. *Nat Neurosci*, *8*(5), 657-663. doi:10.1038/nn1443
- Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., & Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, *305*(5688), 1292-1295. doi:10.1126/science.1101738
- Cunha, A., Gaubert, A., Latxague, L., & Dehay, B. (2021). PLGA-Based Nanoparticles for Neuroprotective Drug Delivery in Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutics*, *13*(7). doi:10.3390/pharmaceutics13071042
- Daniel, J., Godin, A. G., Palayret, M., Lounis, B., Cognet, L., & Blanchard-Desce, M. (2016). Innovative molecular-based fluorescent nanoparticles for multicolor single particle tracking in cells. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *49*(8), 084002. doi:10.1088/0022-3727/49/8/084002
- Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Hunot, S., . . . Meissner, W. G. (2015). Targeting alpha-synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol*, *14*(8), 855-866. doi:10.1016/S1474-4422(15)00006-X
- Dehay, B., Decressac, M., Bourdenx, M., Guadagnino, I., Fernagut, P. O., Tamburrino, A., . . . Bezdard, E. (2016). Targeting alpha-synuclein: Therapeutic options. *Mov Disord*, *31*(6), 882-888. doi:10.1002/mds.26568
- Dehay, B., Martinez-Vicente, M., Caldwell, G. A., Caldwell, K. A., Yue, Z., Cookson, M. R., . . . Bezdard, E. (2013). Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, *28*(6), 725-732. doi:10.1002/mds.25462

- Dehay, B., Ramirez, A., Martinez-Vicente, M., Perier, C., Canon, M. H., Doudnikoff, E., . . . Bezdard, E. (2012). Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *109*(24), 9611-9616. doi:10.1073/pnas.1112368109
- Folts, C. J., Scott-Hewitt, N., Proschel, C., Mayer-Proschel, M., & Noble, M. (2016). Lysosomal Re-acidification Prevents Lysosphingolipid-Induced Lysosomal Impairment and Cellular Toxicity. *PLoS Biol*, *14*(12), e1002583. doi:10.1371/journal.pbio.1002583
- Fraldi, A., Klein, A. D., Medina, D. L., & Settembre, C. (2016). Brain Disorders Due to Lysosomal Dysfunction. *Annu Rev Neurosci*, *39*, 277-295. doi:10.1146/annurev-neuro-070815-014031
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., . . . Iwatsubo, T. (2002). alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*, *4*(2), 160-164. doi:10.1038/ncb748
- Guha, S., Liu, J., Baltazar, G., Laties, A. M., & Mitchell, C. H. (2014). Rescue of compromised lysosomes enhances degradation of photoreceptor outer segments and reduces lipofuscin-like autofluorescence in retinal pigmented epithelial cells. *Adv Exp Med Biol*, *801*, 105-111. doi:10.1007/978-1-4614-3209-8_14
- Johnson, D. E., Ostrowski, P., Jaumouille, V., & Grinstein, S. (2016). The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH. *J Cell Biol*, *212*(6), 677-692. doi:10.1083/jcb.201507112
- Jucker, M., & Walker, L. C. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*, *501*(7465), 45-51. doi:10.1038/nature12481
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2015). Proteostasis and aging. *Nat Med*, *21*(12), 1406-1415. doi:10.1038/nm.4001
- Kim, D., Yoo, J. M., Hwang, H., Lee, J., Lee, S. H., Yun, S. P., . . . Ko, H. S. (2018). Graphene quantum dots prevent alpha-synucleinopathy in Parkinson's disease. *Nat Nanotechnol*, *13*(9), 812-818. doi:10.1038/s41565-018-0179-y
- Koga, H., Martinez-Vicente, M., Macian, F., Verkhusha, V. V., & Cuervo, A. M. (2011). A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy. *Nature Communications*, *2*(1), 386. doi:10.1038/ncomms1393
- Korolchuk, V. I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F. H., Roberts, E. A., Imarisio, S., . . . Rubinsztein, D. C. (2011). Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol*, *13*(4), 453-460. doi:10.1038/ncb2204

- Lee, J. H., McBrayer, M. K., Wolfe, D. M., Haslett, L. J., Kumar, A., Sato, Y., . . . Nixon, R. A. (2015). Presenilin 1 Maintains Lysosomal Ca(2+) Homeostasis via TRPML1 by Regulating vATPase-Mediated Lysosome Acidification. *Cell Rep*, *12*(9), 1430-1444. doi:10.1016/j.celrep.2015.07.050
- Logan, T., Bendor, J., Toupin, C., Thorn, K., & Edwards, R. H. (2017). alpha-Synuclein promotes dilation of the exocytotic fusion pore. *Nat Neurosci*, *20*(5), 681-689. doi:10.1038/nm.4529
- Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2012). Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*, *338*(6109), 949-953. doi:10.1126/science.1227157
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Kaushik, S., Massey, A. C., Mazzulli, J., Mosharov, E. V., . . . Cuervo, A. M. (2008). Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest*, *118*(2), 777-788. doi:10.1172/JCI32806
- Nascimento, A. C., Erustes, A. G., Reckziegel, P., Bincoletto, C., Ureshino, R. P., Pereira, G. J. S., & Smaili, S. S. (2020). α -Synuclein Overexpression Induces Lysosomal Dysfunction and Autophagy Impairment in Human Neuroblastoma SH-SY5Y. *Neurochem Res*, *45*(11), 2749-2761. doi:10.1007/s11064-020-03126-8
- Nixon, R. A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*, *19*(8), 983-997. doi:10.1038/nm.3232
- Prevot, G., Soria, F. N., Thiolat, M. L., Daniel, J., Verlhac, J. B., Blanchard-Desce, M., . . . Dehay, B. (2018). Harnessing Lysosomal pH through PLGA Nanoemulsion as a Treatment of Lysosomal-Related Neurodegenerative Diseases. *Bioconj Chem*, *29*(12), 4083-4089. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00697
- Ramirez-Garcia, P. D., Retamal, J. S., Shenoy, P., Imlach, W., Sykes, M., Truong, N., . . . Bunnett, N. W. (2019). A pH-responsive nanoparticle targets the neurokinin 1 receptor in endosomes to prevent chronic pain. *Nat Nanotechnol*, *14*(12), 1150-1159. doi:10.1038/s41565-019-0568-x
- Recasens, A., Dehay, B., Bove, J., Carballo-Carbajal, I., Dovero, S., Perez-Villalba, A., . . . Vila, M. (2014). Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol*, *75*(3), 351-362. doi:10.1002/ana.24066
- Sahay, G., Alakhova, D. Y., & Kabanov, A. V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release*, *145*(3), 182-195. doi:10.1016/j.jconrel.2010.01.036

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, *9*(7), 676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
- Senturk, M., Lin, G., Zuo, Z., Mao, D., Watson, E., Mikos, A. G., & Bellen, H. J. (2019). Ubiquilins regulate autophagic flux through mTOR signalling and lysosomal acidification. *Nat Cell Biol*, *21*(3), 384-396. doi:10.1038/s41556-019-0281-x
- Song, Q., Meng, B., Xu, H., & Mao, Z. (2020). The emerging roles of vacuolar-type ATPase-dependent Lysosomal acidification in neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener*, *9*(1), 17. doi:10.1186/s40035-020-00196-0
- Soria, F. N. (2021). Lysosome_analysis (Version v.1.0): Zenodo. Retrieved from <https://zenodo.org/record/4432278>
- Soria, F. N., Paviolo, C., Doudnikoff, E., Arotçarena, M. L., Lee, A., Danné, N., . . . Bezar, E. (2020). Synucleinopathy alters nanoscale organization and diffusion in the brain extracellular space through hyaluronan remodeling. *Nat Commun*, *11*, 3440. doi:10.1038/s41467-020-17328-9.
- Soria, F. N., Paviolo, C., Doudnikoff, E., Arotçarena, M. L., Lee, A., Danne, N., . . . Bezar, E. (2020). Synucleinopathy alters nanoscale organization and diffusion in the brain extracellular space through hyaluronan remodeling. *Nat Commun*, *11*(1), 3440. doi:10.1038/s41467-020-17328-9
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, *388*(6645), 839-840. doi:10.1038/42166
- Trist, B. G., Hare, D. J., & Double, K. L. (2019). Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell*, *18*(6), e13031. doi:10.1111/acel.13031
- Tysnes, O. B., & Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, *124*(8), 901-905. doi:10.1007/s00702-017-1686-y
- van Veen, S., Martin, S., Van den Haute, C., Benoy, V., Lyons, J., Vanhoutte, R., . . . Vangheluwe, P. (2020). ATP13A2 deficiency disrupts lysosomal polyamine export. *Nature*, *578*(7795), 419-424. doi:10.1038/s41586-020-1968-7
- Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., & Stefanis, L. (2008). Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem*, *283*(35), 23542-23556. doi:10.1074/jbc.M801992200

- Wallings, R. L., Humble, S. W., Ward, M. E., & Wade-Martins, R. (2019). Lysosomal Dysfunction at the Centre of Parkinson's Disease and Frontotemporal Dementia/Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Trends Neurosci*, *42*(12), 899-912. doi:10.1016/j.tins.2019.10.002
- Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N., & Rubinsztein, D. C. (2003). Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem*, *278*(27), 25009-25013. doi:10.1074/jbc.M300227200
- Xue, X., Wang, L. R., Sato, Y., Jiang, Y., Berg, M., Yang, D. S., . . . Liang, X. J. (2014). Single-walled carbon nanotubes alleviate autophagic/lysosomal defects in primary glia from a mouse model of Alzheimer's disease. *Nano Lett*, *14*(9), 5110-5117. doi:10.1021/nl501839q
- Yang, Q., She, H., Gearing, M., Colla, E., Lee, M., Shacka, J. J., & Mao, Z. (2009). Regulation of neuronal survival factor MEF2D by chaperone-mediated autophagy. *Science*, *323*(5910), 124-127. doi:10.1126/science.1166088

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Acidic nanoparticles rescue lysosomal activity and integrity. (A) Schematic representation of *in vitro* delivery of aNPs into M17 cells. (B) Cell viability expressed as a percentage of untreated human dopaminergic neuroblastoma-derived M17 cells and M17 cells overexpressing human WT α -syn (M17-WTsyn), treated with either non-acidic nanoparticles

(NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) for 24 hours at a dilution of 1:1 000. (*n* = 8). **(C)** Immunofluorescence images and insets of M17 cells treated with Nile red-loaded aNPs and immunostained with LAMP2 as a marker of the lysosomal compartment at 24 hours post-incubation. Scale bar: 10 μ m. **(D)** Lysosomal pH values as measured ratiometrically using LysoSensor Yellow/Blue DND-160 in M17 and M17-WTsyn cells treated with NPs (-) or aNPs (+) for 24 hours (1:1 000). *n*=3-6 per group **(E-F)** Lysosomal β -hexosaminidase **(E)** and acid phosphatase precursor 2 (ACP2) **(F)** activity assay expressed as a percentage of NPs-treated M17 in M17 and M17-WTsyn cells treated with NPs (-) or aNPs (+) for 24 hours (1:1 000). *n*= 3-6 per group. **(G-I)** Cytosolic β -hexosaminidase **(G)**, acid phosphatase precursor 2 (ACP2) **(H)**, and cathepsin D (CatD) **(I)** activity assay expressed as a percentage of NPs-treated M17 cells in M17 and M17-WTsyn cells treated with NPs (-) or aNPs (+) for 24 hours (1:1 000). *n*=3-6 per group. **(J-K)** Quantification **(J)** and illustrative images **(K)** of Gal3-positive dots per cell in M17 and M17-WTsyn cells transfected with mCherry-LGALS3/galectin-3 (Gal3) probe (red, the nucleus in blue) for 24 hours and treated with NPs (-) or aNPs (+) for 24 hours (1:1 000). The lower panel of K constitutes a binarized representation of the mCherry channel. *n*=23-67 cells per condition. Scale bar: 10 μ m. All data are expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. **p* < 0.05.

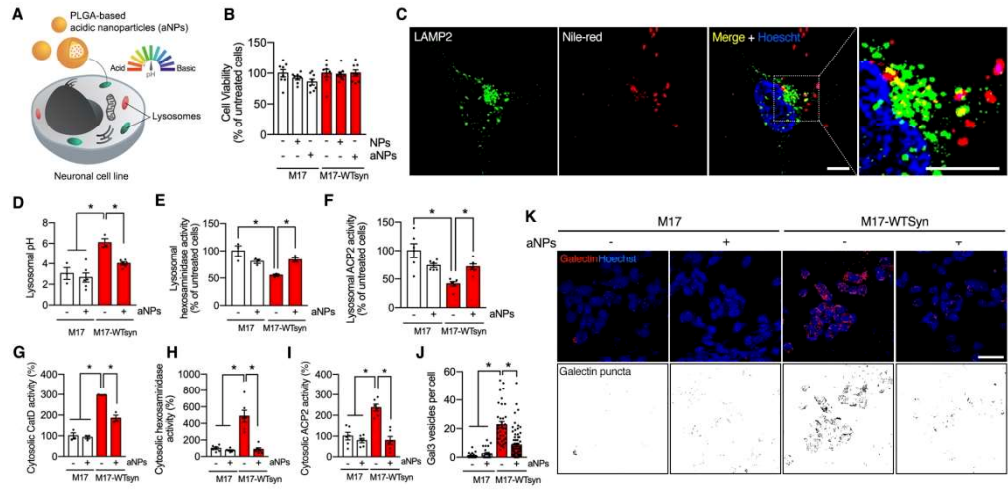
Figure 2. Acidic nanoparticles increase α -syn degradation through induction of the autophagy-lysosomal pathway. **(A-B)** Representative images **(A)** and immunoblot quantification **(B)** of LC3 protein levels normalized by actin in M17-WTsyn cells treated with NPs or aNPs for 24 hours (1:1 000) and co-treated (+) or not (-) with BafilomycinA1 (BafA) at 500nM for 1 hour before the end of NPs/aNPs treatment. *n*=3 per group. **(C-D)** Quantification **(C)** and illustrative images **(D)** of LC3-positive dots per cell in M17 and M17-

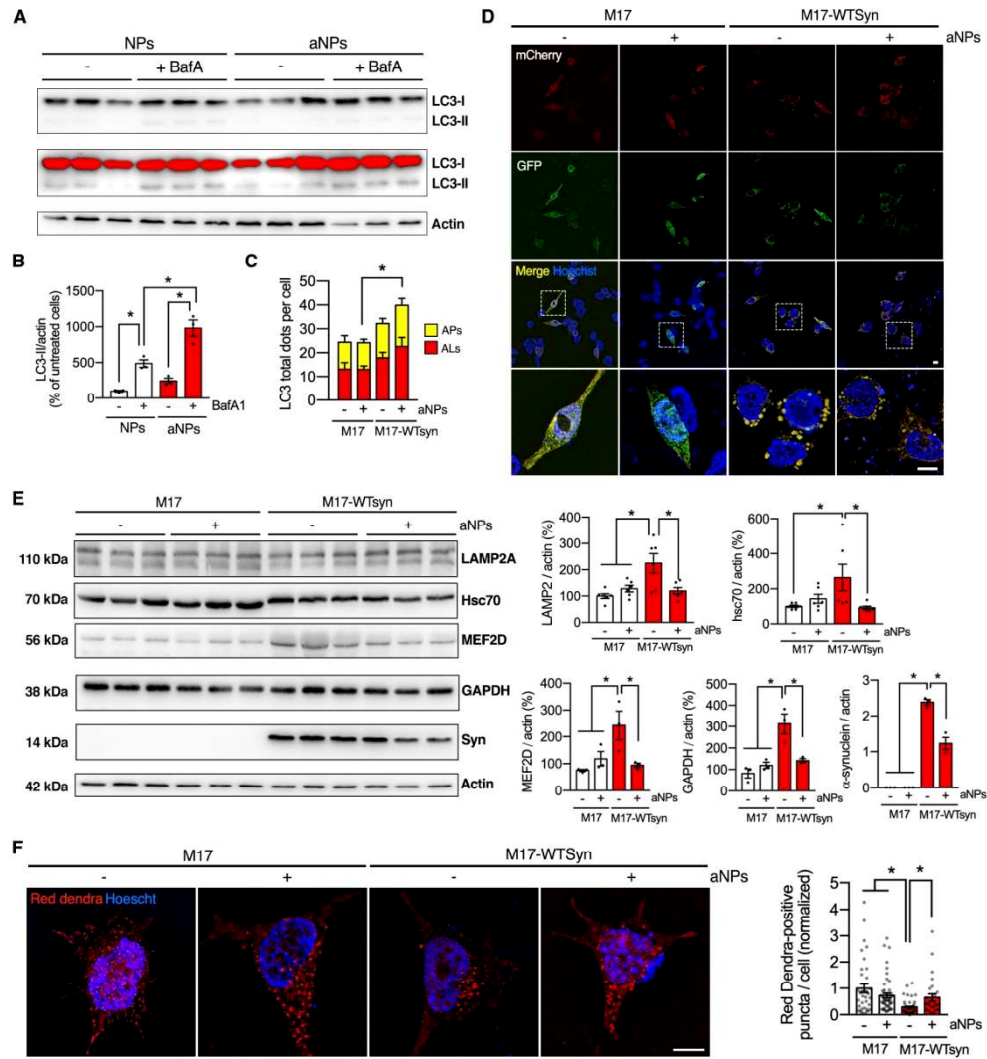
WTsyn cells transfected with a mCherry-GFP-LC3 plasmid for 24 hours and treated with NPs (-) or aNPs (+) for 24 hours (1:1 000). Scale bar: 10 μ m. **(E)** Representative images (*left*) and immunoblot quantifications (*right*) of LAMP2A, Hsc70, α -synuclein, GAPDH, and MEF2D protein levels normalized by actin in M17 and M17-WTsyn cells treated with NPs or aNPs for 24 hours (1:1 000). $n = 3-6$ per group. **(F)** Illustrative images (*left*) and quantification (*right*) of red Dendra-positive dots per cell in M17 and M17-WTsyn cells infected with a KFERQ-PS-Dendra lentivirus for 48 hours and treated with NPs (-) or aNPs (+) for 24 hours (1:1 000). Scale bar: 10 μ m. Two-way ANOVA and Tukey's (A-E) or Kruskal-Wallis (F) correction for multiple comparisons. APs: autophagosomes; ALs: autophagolysosomes. $*p < 0.05$. All data are expressed as mean \pm SEM.

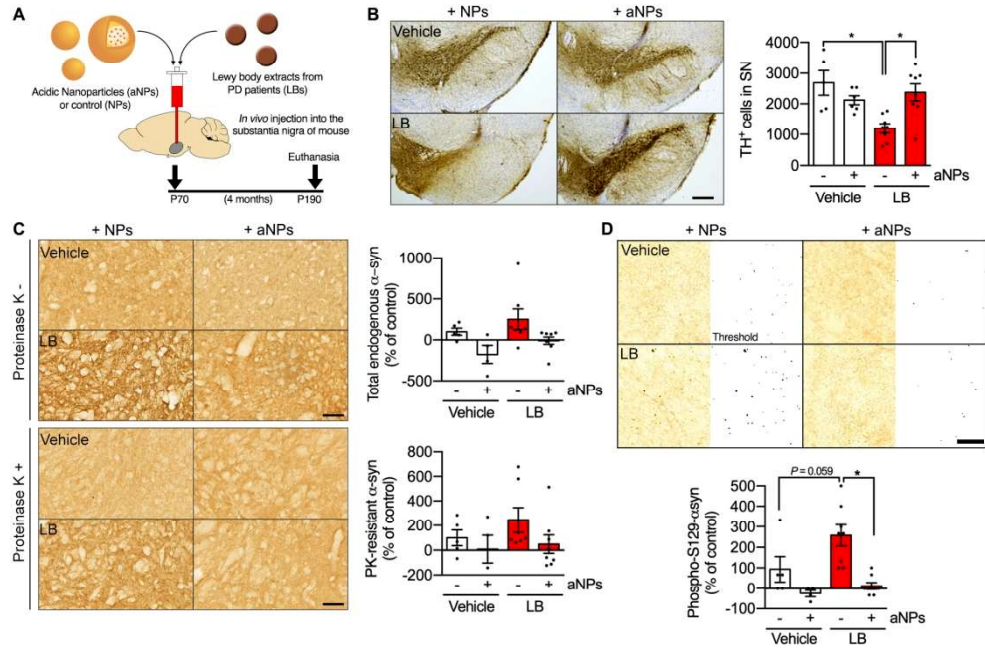
Figure 3. Acidic nanoparticles prevent α -syn-induced neurodegeneration and synucleinopathy in mice. **(A)** Schematic and timeline of the experimental procedure. **(B)** Representative images (*left*) and quantification (*right*) of Tyrosine Hydroxylase (TH)-positive neurons by stereological counting in the substantia nigra (SN) of control (Vehicle) and LB-injected mice 4-months after injection of non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs). Scale bar: 500 μ m. **(C)** Representative images (*left*) and quantification (*right*) of α -synuclein immunostaining without (*up*) or with (*bottom*) proteinase K (PK) treatment using syn1 antibody in the SN of control (Vehicle) and LB-injected mice 4-months after injection of non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs). Scale bar: 200 μ m. **(D)** Representative (*up, left*), binarized (*up, right*) images and quantification (*bottom*) of S129-phosphorylated α -synuclein immunostaining using EP1536Y antibody in the SN of control (Vehicle) and LB-injected mice 4-months after non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs). Each dot represents an animal. $n=5-8$ per group. All data are

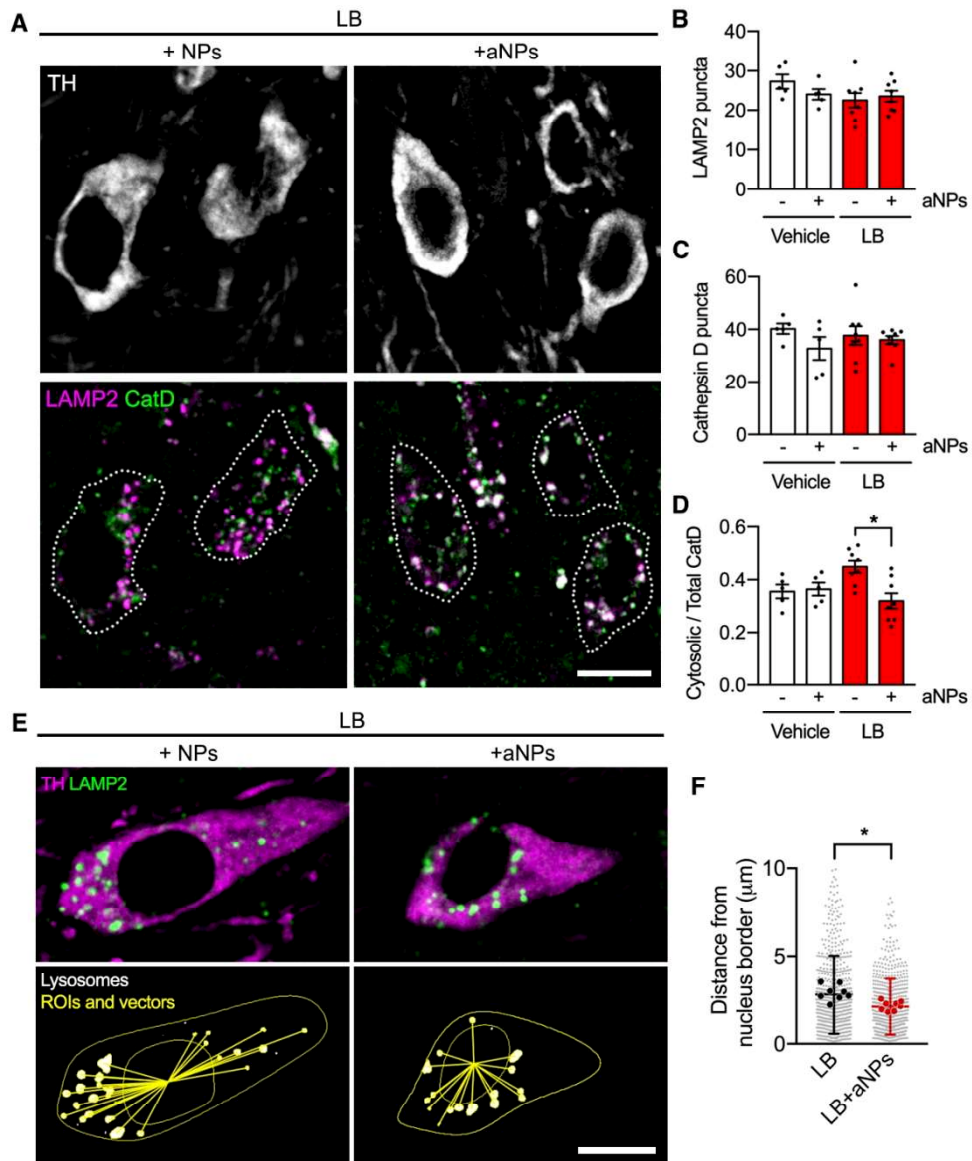
expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. $*p < 0.05$.

Figure 4. Acidic nanoparticles induce lysosomal recovery in dopaminergic neurons in LB-injected mice. (A) Representative confocal micrographs of triple immunostaining for dopaminergic marker tyrosine hydroxylase (TH), lysosomal marker (LAMP2), and lysosomal protease Cathepsin D (CatD), in the substantia nigra (SN) of LB-injected mice four months after non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) injections. Scale bar = 10 μ m. (B-C) Quantification of lysosomal and CatD puncta in TH-positive neurons from the SN of control (Vehicle) and LB-injected mice four months after non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) injections. Mean \pm SEM. Each dot represents an animal. $n = 5-8$. Two-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. (D) Lysosomal membrane permeabilization represented as the ratio of cytosolic CatD over total CatD, quantified from colocalization images as in (A, right panel). Mean \pm SEM. Each dot represents an animal. $n = 5-8$. Two-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. $*p < 0.05$. (E-F) Image segmentation analysis (E) and quantification (F) to examine lysosomal distance to the nucleus. LAMP2-positive lysosomes were segmented, and the distance to the border of the nuclear ROI (traced in the TH channel) was calculated for each lysosome. Scale bar = 10 μ m. Mean \pm SD, $n = 8$ (Each hard dot represent an animal, semi-transparent dots represent individual lysosomes), Mann-Whitney U test, $*p < 0.05$.









SUPPLEMENTAL INFORMATION

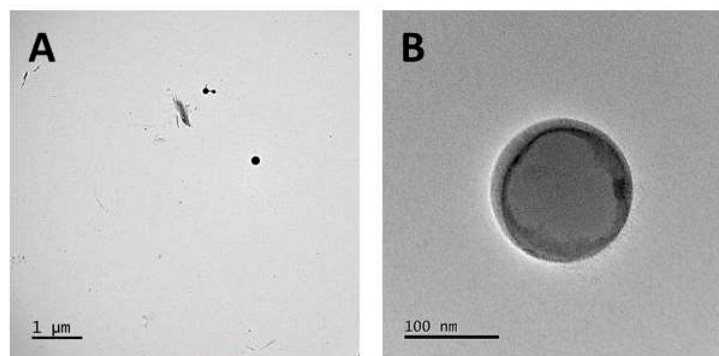


Figure S1. TEM images of acidic nanoparticles. Transmission electron microscopy imaging of aNPs obtained using (A) a HITACHI H7650 (HITACHI Ltd., Tokyo, Japan) electron microscope at 80 kV and (B) a TALOS F200S (ThermoFisher Talos) electron microscope at 190 kV. Observation was made after a negative staining with uranyl acetate.

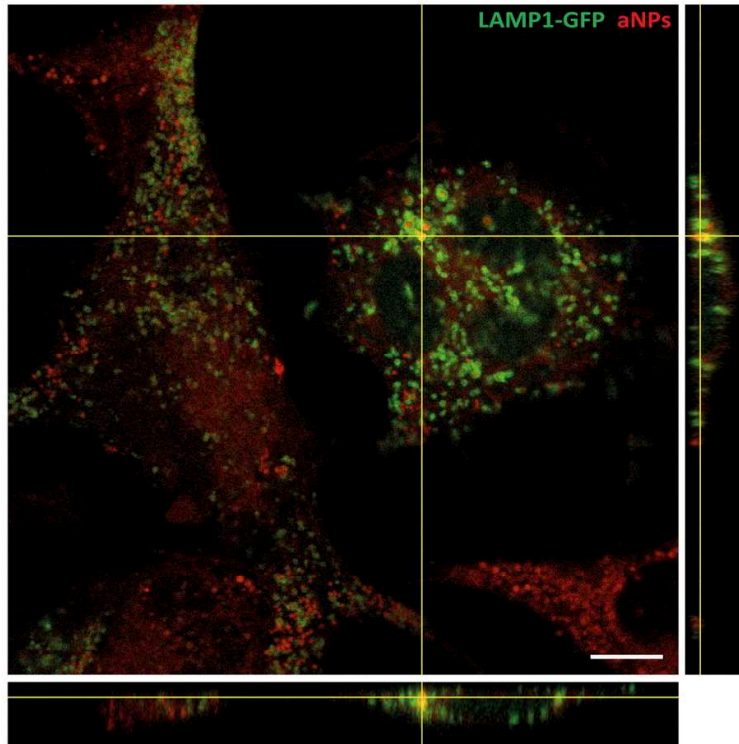


Figure S2. Acidic nanoparticles are detected in lysosomes. Orthogonal projection of a confocal z-stack of in vitro immunofluorescence. Note the colocalization between acidic NPs (red) and lysosomal marker (LAMP1-GFP signal; green). Scale bar: 10 μ m.

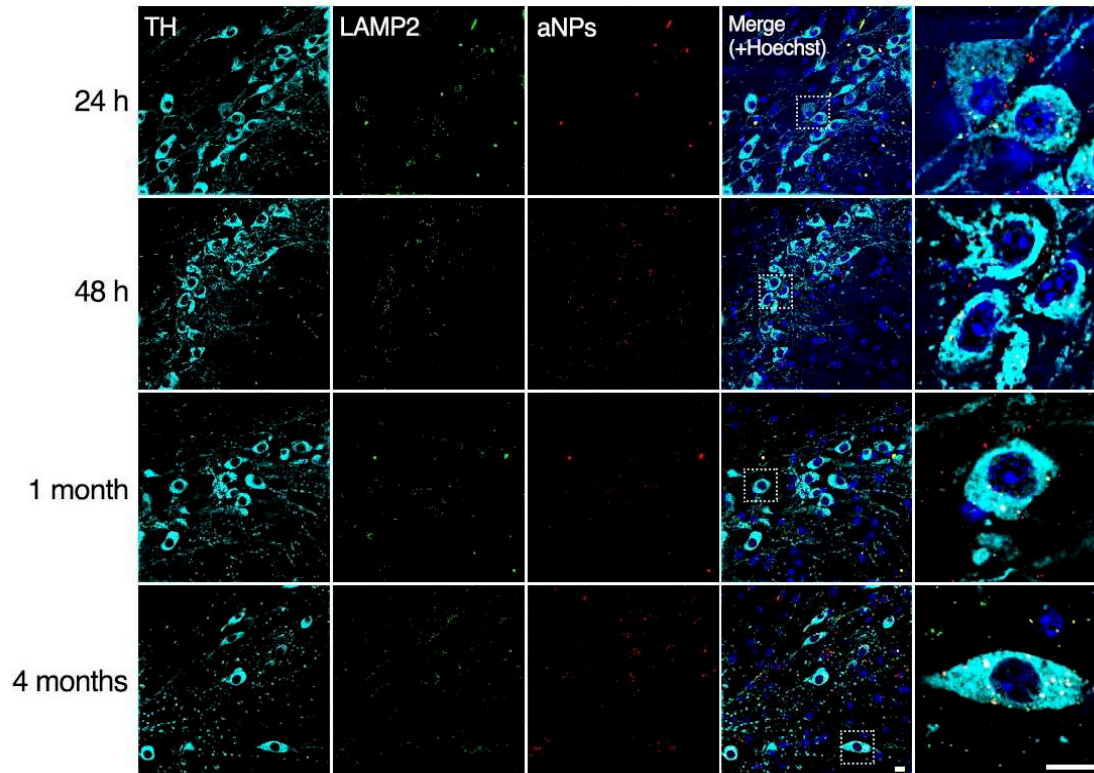


Figure S3. Acidic nanoparticles are internalized into lysosomes in the nigral dopaminergic neurons of mice. Representative immunofluorescent images of lysosomal marker LAMP2 (*green*) and Nile red-loaded aNPs (*red*) in Tyrosine Hydroxylase (TH)-positive neurons (*cyan*) of the substantia nigra of mice at 24h, 48h, 1- and 4-month post-injection. Right panels represent insets in a high magnification picture of TH-positive neurons present in the white square. Scale bar: 10 μ m.

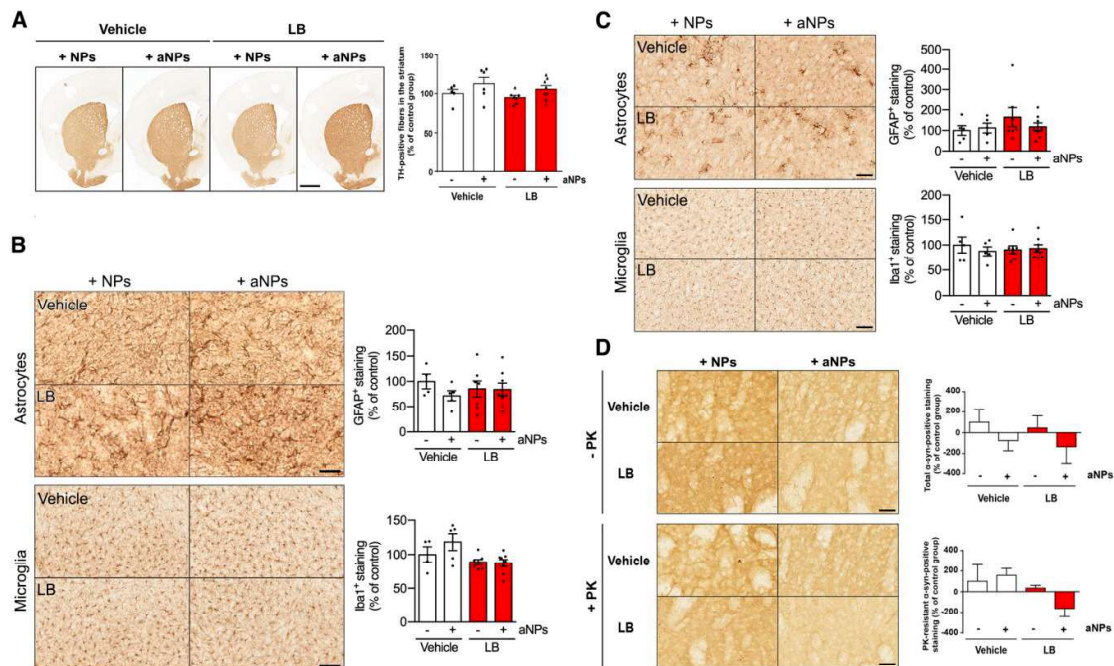


Figure S4. Acidic nanoparticles do not induce striatal changes nor inflammatory reaction after intranigral injection in mice. (A) Representative images (*left*) and quantification (*right*) of Tyrosine Hydroxylase (TH) immunostaining measured by optical density in the striatum of control (Vehicle) and LB-injected mice four months after non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) injections. Scale bar: 1mm. (B) Representative images (*left*) and quantification (*right*) of GFAP/S100-positive astrocytic (*up*) or Iba1-positive microglial cells (*bottom*) immunostaining in the substantia nigra (SN) of control (Vehicle) and LB-injected mice 4-months after injection of non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs). Scale bar: 200 μ m. (C) Representative images (*left*) and quantification (*right*) of GFAP/S100-positive astrocytic (*up*) or Iba1-positive microglial cells (*bottom*) in the striatum of control (Vehicle) and LB-injected mice four months after non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) injections. (D) Representative images (*left*) and quantification (*right*) of α -synuclein immunostaining without (*up*) or with (*bottom*) proteinase K (PK) treatment using syn1 antibody in the striatum of control (Vehicle) and LB-injected mice four months after non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) injections. Scale bar: 200 μ m. All panels: $n = 5-8$. Two-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. All data are expressed as mean \pm SEM.

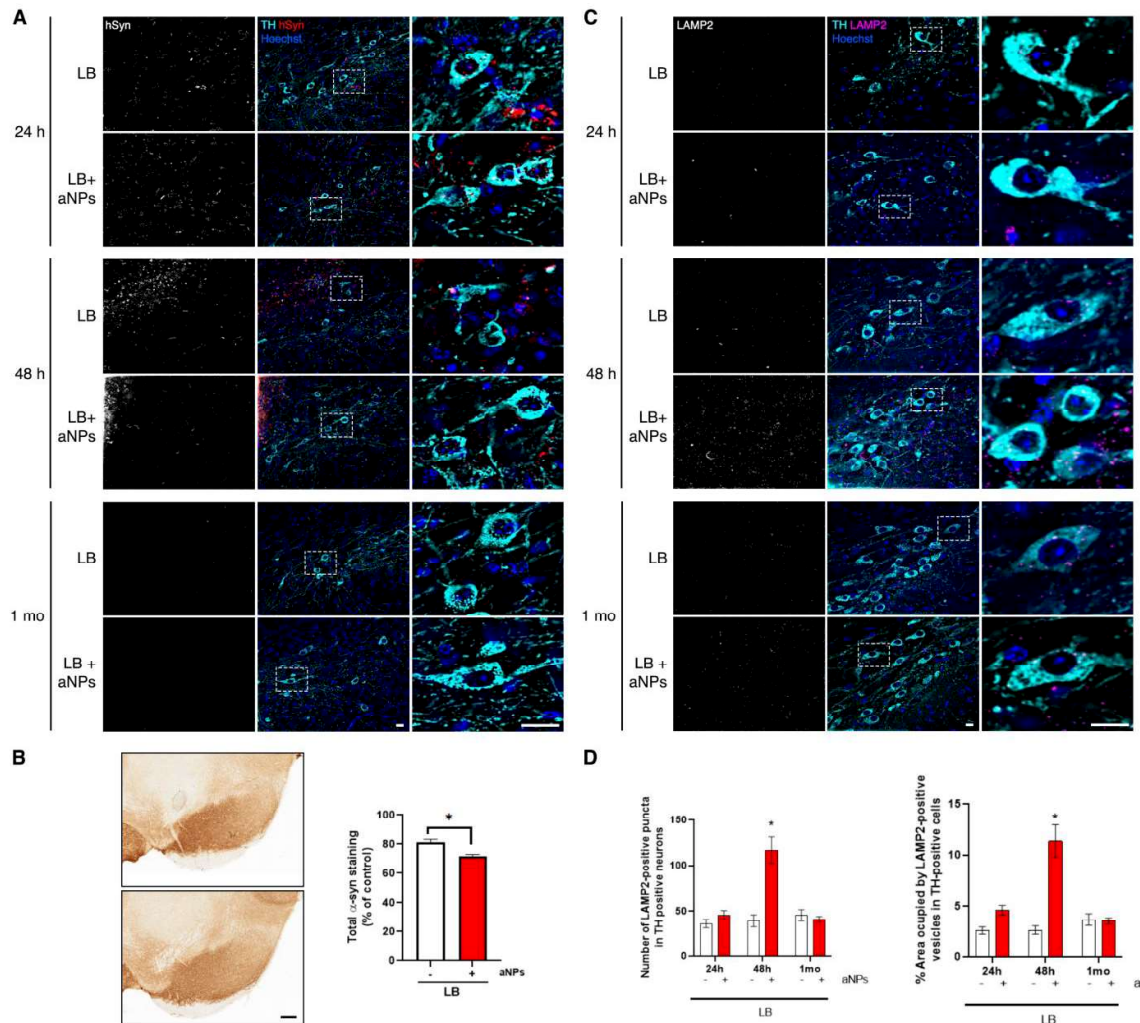


Fig. S5. Acidic nanoparticles prevent synucleinopathy induction and induce lysosomal biogenesis. (A) Representative immunofluorescent images of the human α -synuclein immunostaining (red) using Syn211 antibody in the Tyrosine Hydroxylase (TH)-positive neurons (cyan) of the substantia nigra of LB-injected and LB+aNPs-injected mice at 24h, 48h and 1-month post-injection. White squares were represented as insets in a high magnification picture. Scale bar: 10 μ m. (B) Representative images (left) and quantification (right) of murine α -synuclein immunostaining using D37A6 antibody measured by optical density in the substantia nigra of LB-injected mice 1-month after non-acidic nanoparticles NPs (-) or acidic nanoparticles aNPs (+) injections. Scale bar: 200 μ m. (C) Representative immunofluorescent images of the lysosomal marker LAMP2 (purple) in the Tyrosine Hydroxylase (TH)-positive neurons (cyan) of the substantia nigra of LB-injected mice at 24h, 48h and 1-month after non-acidic nanoparticles (LB) or acidic nanoparticles (LB+aNPs) injections. Selected white squares were represented as insets in a high magnification picture. Scale bar: 10 μ m. (D) Quantification of the number of (left) and percentage of area occupied by (right) LAMP2-positive puncta present in the Tyrosine Hydroxylase (TH)-positive neurons of the substantia nigra of LB-injected mice at 24h, 48h and 1-month after non-acidic nanoparticles NPs (-) or acidic nanoparticles aNPs (+) injections. A total of 7-41 neurons were assessed per group. n=2-3 animals per group. All data are expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons.

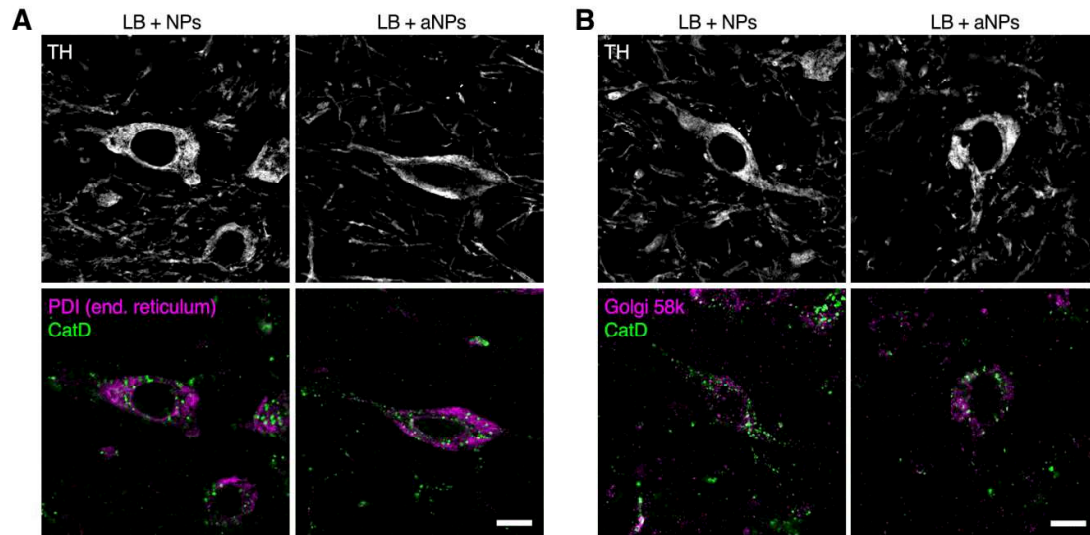
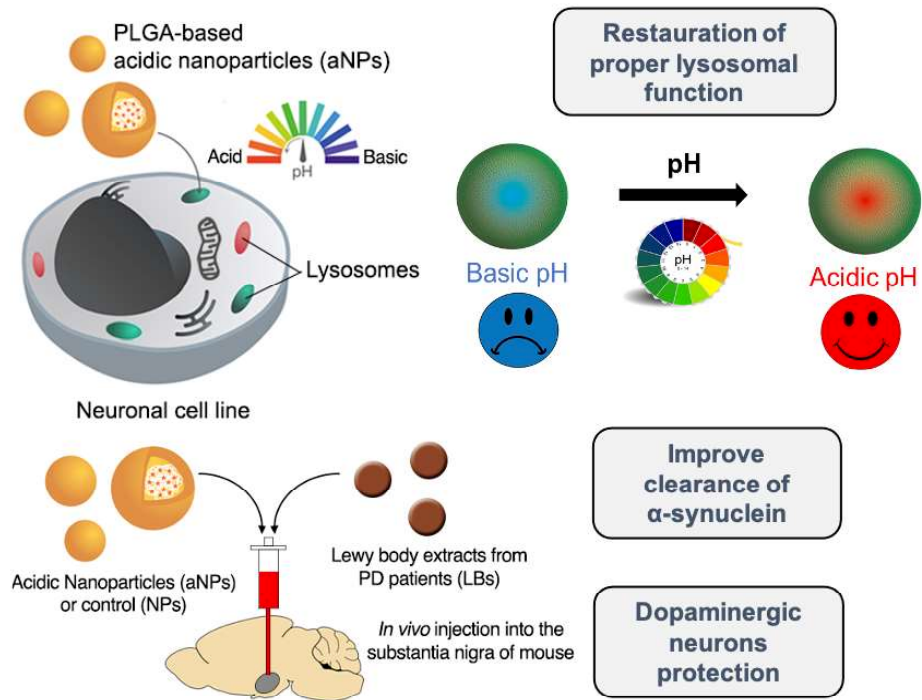


Figure S6. Lysosomal protease Cathepsin D is not localized in the reticulum endoplasmic or the Golgi apparatus of the dopaminergic neurons in the SN of LB-injected mice after aNPs administration. (A) Representative confocal micrographs of triple immunostaining for the dopaminergic marker tyrosine hydroxylase (TH), the endoplasmic reticulum marker (PDI), and the lysosomal protease Cathepsin D (CatD) in the substantia nigra (SN) of LB-injected mice at 4-months after non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) injections. (B) Representative confocal micrographs of triple immunostaining for the dopaminergic marker tyrosine hydroxylase (TH), the Golgi marker (58K protein) and the lysosomal protease Cathepsin D (CatD), in the substantia nigra (SN) of LB-injected mice four months after non-acidic nanoparticles (NPs) or acidic nanoparticles (aNPs) injections. Scale bar = 10 μ m.



77x61mm (300 x 300 DPI)

Chapitre VI : Développement de NPs à base de GNLs pour l'administration de substances actives

1- Développement et synthèse de dérivés glyconucléolipidiques

Depuis les premiers développements des nucléolipides synthétiques, la synthèse de ces composés amphiphiles s'est développée de façon exponentielle. De nombreuses publications décrivent la préparation de NLs impliquant divers types de réactions selon les structures souhaitées et le nucléoside/nucléotide utilisé. L'équipe ChemBioPharm s'intéresse en particulier à la conception de nouvelles structures amphiphiles bio-inspirées pour des applications aussi diverses que les auto-assemblages (hydrogels, organogels), les substances actives, les systèmes de délivrance, de transfection, ... En tirant parti des forces qui maintiennent ensemble les dérivés d'acides nucléiques (Watson-Crick, Hoogsteen, liaisons hydrogènes et $\pi-\pi$ *stacking*) les structures amphiphiles originales élaborées dans l'équipe possèdent toutes une unité de reconnaissance de l'ADN (une nucléobase) et un segment hydrophobe (chaîne grasse) ce qui en fait un nucléolipide (NL), et plus récemment un sucre d'où la dénomination de glyconucléolipide (GNL). En effet, de nombreuses positions sont fonctionnalisables sur les nucléobases (amine, amide), mais également sur les riboses ou désoxyriboses (en position 2', 3', ou 5') qui les composent. Ces positions permettent d'envisager l'introduction d'éléments tels qu'une chaîne lipidique, un fluorophore, un glucide ou une substance active au moyen de liens de type ester, éther, amide ou triazole, ce que nous illustrons dans cette section (**Figure 25**).

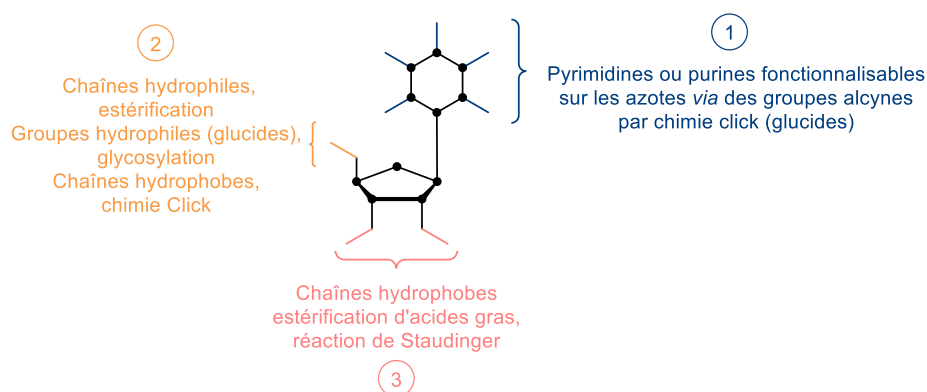


Figure 25 : Différents types de fonctionnalisations des nucléosides par l'équipe du Pr. Philippe Barthélémy. (1) Fonctionnalisation de la nucléobase [179,180]. (2) Fonctionnalisation de la position 5' du ribose [174,179,181]. (3) Fonctionnalisation des positions 2' et 3' du ribose [168,182,183].

Dans le cadre de cette thèse, des réactions d'estérification et de chimie click ont été principalement exploitées. La réaction d'estérification sur les groupes hydroxyles du ribose s'appuie sur la réaction de Steglich [184] qui s'effectue dans des conditions très douces de température. Elle utilise un acide carboxylique préalablement activé au moyen de *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), dont la réactivité électrophile est similaire à celle des cétènes ou des isocyanates, et de DMAP (4-diméthylaminopyridine) catalytique pour produire l'ester désiré et la dicyclohexylurée (DCU) comme sous-produit. Étant insoluble en phase organique son élimination s'effectue par filtrations successives. Il a également été montré que des composés tels que le 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) et le 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) permettent de diminuer la racémisation et la formation de *N*-acylurée lors des couplages avec le DCC. Néanmoins, pour s'affranchir de la formation de DCU des protocoles alternatifs utilisent du *N*-éthyl-*N*-(3-diméthylaminopropyle) carbodiimide (EDC) qui conduit à un sous-produit soluble dans l'eau, ou du *N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIC). Ainsi, une fonction acide carboxylique va réagir avec le carbodiimide formant ainsi le dérivé *O*-acyl urée correspondant. Cet intermédiaire est plus réactif et peut de cette façon être facilement converti en ester ou encore en amide (**Figure 26**).

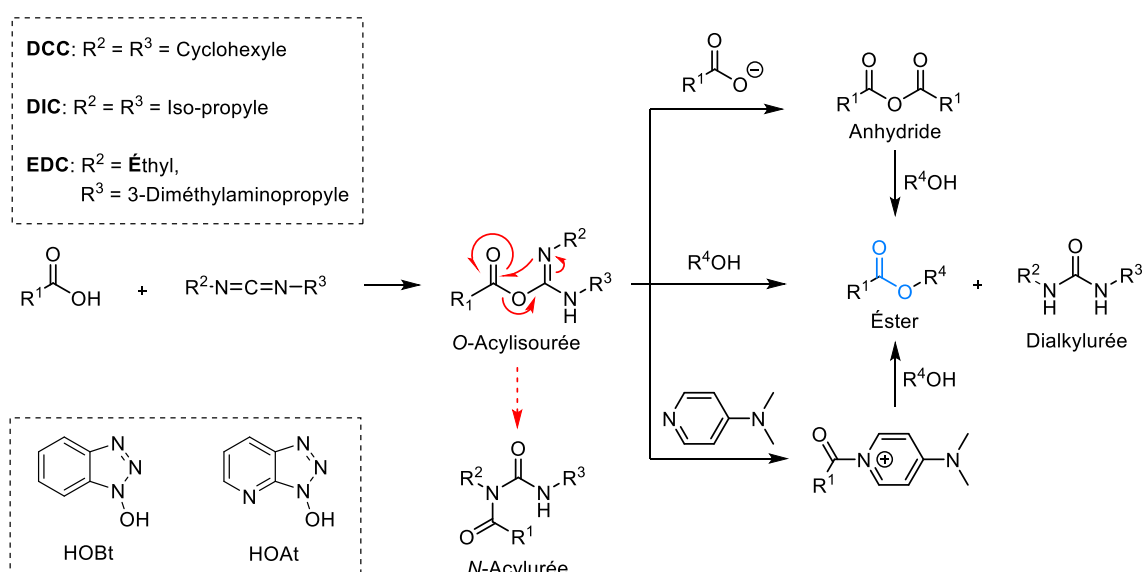


Figure 26. Création de lien ester *via* l'utilisation de carbodiimides. Le DCC, l'EDC et la DIC peuvent être utilisés pour coupler un acide carboxylique à un hydroxyle libre. Adapté de Tsakos et al. [185].

Inspirées des réactions naturelles, des estérifications enzymatiques peuvent aussi être envisagées. Elles se positionnent en complément ou en remplacement des estérifications par voie chimique généralement pour répondre à une problématique environnementale (diminution des coûts énergétiques et du nombre d'étapes de synthèse grâce à la sélectivité des enzymes). Voici quelques exemples d'enzymes utilisées, les estérases, les lipases [186,187], les acyles transférases et certaines protéases. La création du lien ester reste donc très accessible et bénéficie d'une large variété de protocoles expérimentaux adaptables à la synthèse des nucléolipides [188–191]. Néanmoins, les liens esters sont sensibles aux clivages en milieu biologique, et lorsque cela constitue un inconvénient, la chimie click permet quant à elle l'intégration d'une chaîne lipidique ou glucidique par un lien de type triazole insensible au clivage enzymatique, oxydatif, hydrolytique, ...

La chimie click est un concept introduit par K.B Sharpless en 2001, réunissant un groupe de réactions s'inspirant de la nature (biomimétisme) présentant les conditions et intérêts suivants : une réaction de chimie click doit-être biocompatible, propre, réalisable en milieu aqueux, avec un très haut rendement, économe en atomes, Les réactions de chimie click, peuvent être divisées en plusieurs catégories dont les principales sont : les réactions polaires, les réactions organométalliques, les réactions de cycloaddition de type Diels-Alder et de type dipolaire. Parmi ces réactions, la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen [192], décrite pour la première fois en 1893 par Arthur Michael mais développée plus tard par Rolf Huisgen, est l'une des plus réputées et des plus utilisées depuis ces dernières années. À l'origine, cette réaction était réalisée dans des conditions thermodynamiques à haute température (100°C), entre un dérivé azoture et un alcyne vrai pour former deux régioisomères, les dérivés 1,4 et 1,5-triazole (**Figure 27**).

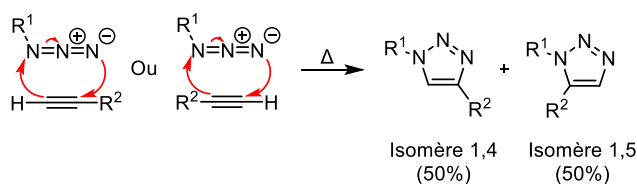


Figure 27. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen thermique. Deux isomères peuvent être obtenus à l'issue de cette réaction thermique.

L'obtention de l'un des deux isomères en majorité par rapport à l'autre pouvait être atteinte en fonction de la nature des groupements voisins des alcynes et azotures (la présence de groupements électroattracteurs sur l'alcyne permettait d'obtenir plus facilement le dérivé

1,4-triazole alors que la présence d'un groupement électroattracteur sur l'azoture facilitait l'obtention du dérivé 1,5-triazole).

En 2002, une nouvelle version de cette réaction a été découverte simultanément par les groupes de Sharpless (États-Unis) [193] et de Meldal (Danemark) [194]. Ces deux équipes ont utilisé des sels de cuivre (I) pour catalyser la réaction, *via* l'ascorbate de sodium et le sulfate de cuivre, donnant ainsi lieu à la réaction connue de nos jours sous le nom de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre (CuAAC). Ces nouvelles conditions expérimentales ont grandement diminué le temps et les températures de réaction ainsi qu'augmenté la spécificité de la réaction pour obtenir le dérivé 1,4 triazole. Néanmoins, les mécanismes de cette réaction restent toujours sujet à discussion et non complètement élucidés. Tout d'abord décrit comme un mécanisme impliquant un seul atome de cuivre avec la formation d'un intermédiaire mononucléaire, Forkin *et al.*, ont ensuite montré la possible formation d'un intermédiaire dinucléaire et donc l'implication de plusieurs atomes de cuivre. Quoiqu'il en soit, la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre a par la suite gagné une telle popularité elle est utilisée dans la plupart des synthèses de bioconjugués, en particulier celles des dérivés de nucléosides [195] (**Figure 28**).

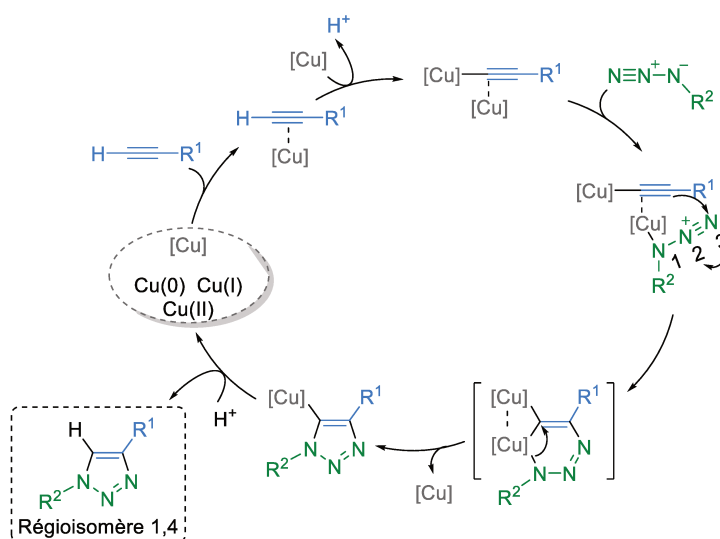


Figure 28. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre (CuAAC). Cycle catalytique à deux atomes de cuivre.

1.1- Synthèse des GNLs en série thymidine

La stratégie de synthèse de NLS-tréhalose dérive de méthodes déjà obtenues au sein du laboratoire. Dans le cas présent, les GNL cibles possèdent un cœur hydrophile composé d'une unité nucléosidique (thymidine ou adénosine) liée au tréhalose par un espaceur, et d'une chaîne

lipidique (issue de la dodécylamine C12) (**Figure 29**). La synthèse convergente de ces composés fait appel à l'utilisation des réactions décrites précédemment pour l'intégration de la chaîne lipidique ou une étape d'estérification pour le couplage de la nucléobase au tréhalose. La première série de GNLs a été synthétisée à partir de la thymidine comme nucléoside, celle-ci représentant un modèle simple pour le développement d'une nouvelle voie synthétique. Deux voies de synthèse ont été envisagées, la première impliquant l'ajout d'un espaceur directement sur le tréhalose avant couplage (**Figure 29 voie bleue**) et la seconde l'ajout de l'espaceur sur le nucléoside suivi de l'estérification avec le sucre (**Figure 29 voie verte**).

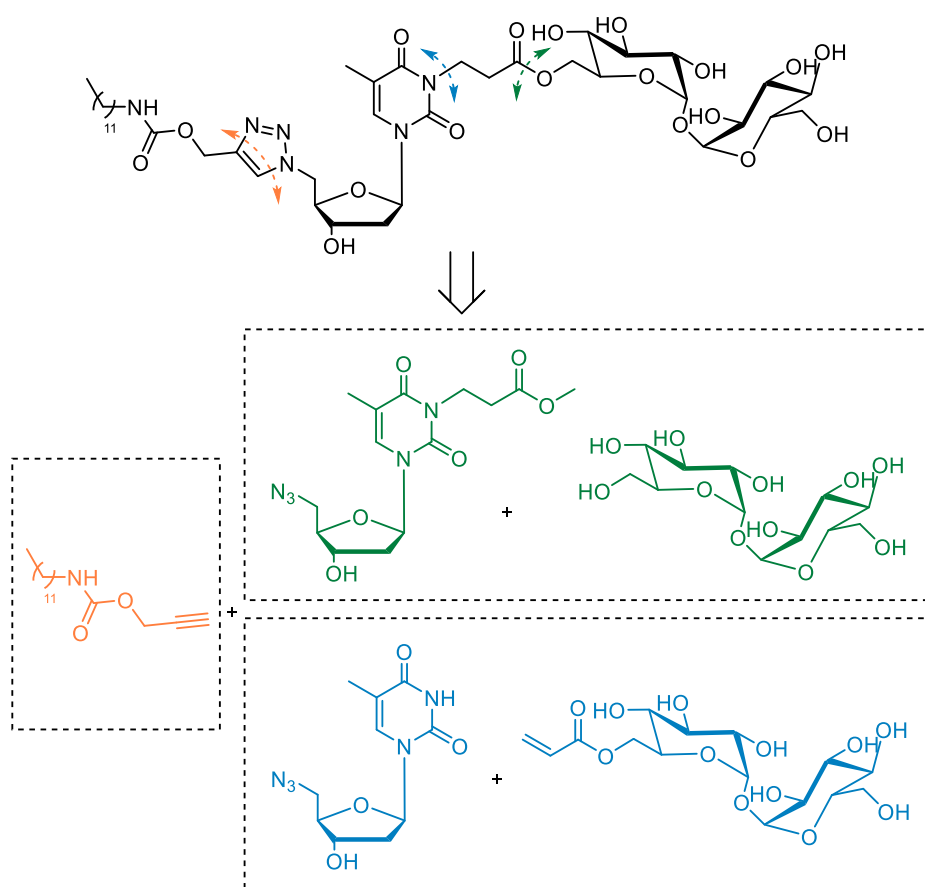


Figure 29. Schéma rétrosynthétique des GNLs en série thymidine. La première voie implique l'ajout de l'espaceur sur le nucléoside suivi de l'estérification avec le sucre (voie verte) et la deuxième l'ajout de l'espaceur directement sur le tréhalose avant couplage (voie bleue).

Dans les deux cas, la partie lipidique est préparée par réaction de la dodécylamine (une chaîne de taille moyenne) sur le chloroformate de propargyle avec un rendement quasi quantitatif et un lien de type carbamate est ainsi obtenu entre la partie lipidique et le nucléoside [196].

1.1.1- Première voie de synthèse

Nous décrivons dans un premier temps la voie de synthèse **verte** (**Figure 30**).

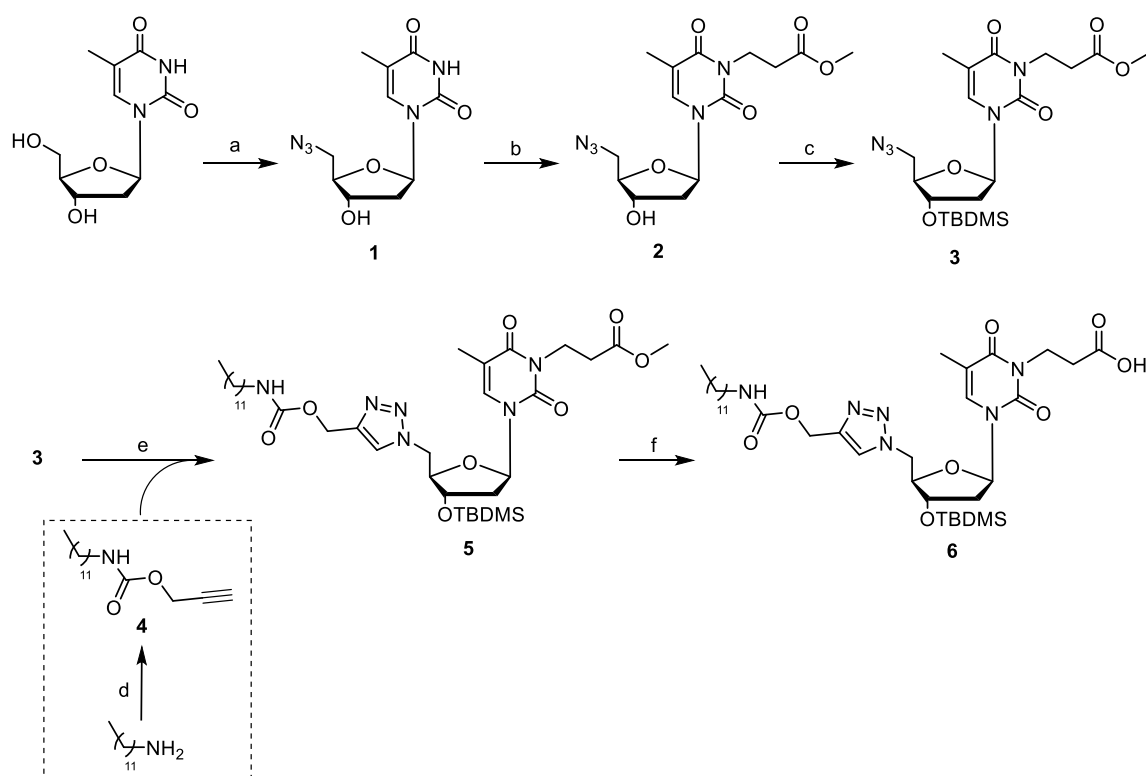


Figure 30. Schéma général de synthèse conduisant à l'obtention des parties nucléolipidiques. Réactifs et conditions : **a** – PPh_3 (1,2 éq.), NaN_3 (5 éq.), CBr_4 (1,2 éq.), DMF anhydre, 24 h, T.A., 74% ; **b** – DBU (1,55 éq.), acrylate de méthyle (1,55 éq.), DMF anhydre, 16 h, 60 °C, 66% ; **c** – TBDMSCl (1,2 éq.), imidazole (1,2 éq.), DMF anhydre, 15 h, T.A., 86% ; **d** – triéthylamine (1,05 éq.), chloroformate de propargyle (1 éq.), DCM anhydre, 3 h, 0 °C, 97% ; **e** – $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,1 éq.), ascorbate de sodium (0,2 éq.), THF/ H_2O (1 : 1), 15 h, 60 °C, 87% ; **f** – NaOH (1N) dans du méthanol anhydre, 1,4-dioxane anhydre, 15h, T.A., 73%.

Cette voie de synthèse a débuté par la modification spécifique de la thymidine *via* une réaction d'Appel (adaptée de Rowan *et al.* [197]) puis d'une substitution *in-situ* du brome par l'azoture (**Figure 31**). Cette étape a permis de préparer à l'avance en grandes quantités la 5'-azidothymidine **1** en présence de triphénylphosphine, tétrabromure de carbone et azoture de sodium dans du DMF anhydre, permettant le futur ajout de la chaîne lipidique par chimie click. Après purification pour retirer l'oxyde de triphénylphosphine, le produit **1** a été obtenu avec un rendement d'environ 74% (**Figure 31**).

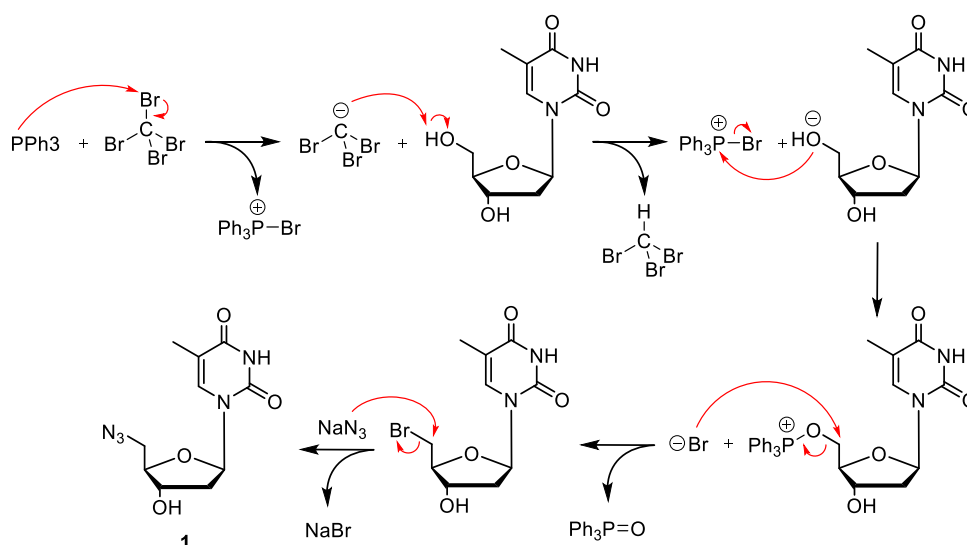


Figure 31. Mécanisme d'obtention de la 5'-azidothymidine. Cette réaction passe par la formation d'un intermédiaire de type bromure d'alkyle avant la substitution par l'azote.

Dans l'étape suivante un espaceur court (propanoate de méthyle) a été introduit entre la 5'-azidothymidine (Azdt) et le tréhalose. Ce choix a été dicté par la volonté d'éloigner le tréhalose volumineux du nucléoside et conférer plus de flexibilité stérique à l'ensemble. De plus, l'espaceur portait une fonction facilitant la liaison ultérieure avec le tréhalose, *i.e.* le 3-bromopropionate de méthyle commercial. Différents protocoles de substitution du brome par l'azote N-3 de la thymidine en milieu basique ont été étudiés. Les premiers protocoles ont été effectués avec une base faible (K_2CO_3) à différentes températures (**Figure 32-b-i, ii et iii**). Un essai impliquant l'utilisation d'une base plus forte (NaH) et une activation par micro-ondes a également été testé (**Figure 32-b-iv**). Lors de la réaction aux micro-ondes deux étapes d'activation ont été utilisées et ont permis la déprotonation du nucléoside puis la substitution de l'atome de brome. Pourtant aucune de ces tentatives n'a conduit à l'obtention du composé désiré. L'espaceur a dès lors été changé au profit du métacrylate de méthyle, également commercial, qui a été engagé dans une addition-1,4 de Michael. Au moyen de DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène) dans le DMF anhydre, suivant la procédure décrite par M.C. Bonache en 2003 [198], le composé **2** a été obtenu avec 66 % de rendement.

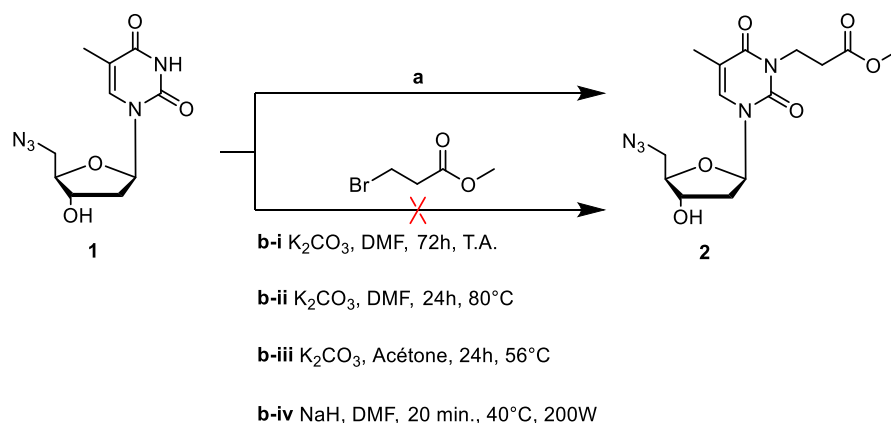


Figure 32. Les premières voies de synthèses étudiées pour l'ajout de l'espaceur. *a* – DBU (1,55 éq.), acrylate de méthyle (1,55 éq.), DMF anhydre, 16 h, 60 °C, 66% ; *b*- Les réactions de substitution à partir du 3-bromopropionate de méthyle n'ont pas conduit au produit désiré.

Le groupement hydroxyle secondaire en position 3' du désoxyribose a ensuite été protégé sous forme d'éther tert-butyldiméthylsilyle afin d'éviter l'obtention de sous-produits non désirés lors des étapes suivantes. En effet, les premiers essais ont montré qu'un nucléoside non protégé en position 3' pouvait compliquer voire empêcher l'étape de couplage entre le nucléoside et le tréhalose-TMS₆. La synthèse du nucléolipide proprement dit s'est achevée en introduisant le dodécyl carbamate de propargyle **4** sur le nucléoside protégé **3** par chimie click. Le composé **5** obtenu a ensuite été saponifié. L'acide résultant **6** a pu dès lors être facilement activé pour le couplage avec le tréhalose afin de fournir le **GNL** cible.

Deux protocoles permettant de synthétiser le précurseur tréhalose ont été étudiés, chacun d'entre eux comportant deux étapes réactionnelles. Ces deux étapes se sont déroulées « *one pot* », et ont débuté par la per-silylation du tréhalose dihydrate à partir de triméthylchlorosilane (TMSCl) dans le cas du premier protocole et de N,O-bistriméthylsilylacétamide dans le cas du second. Cette étape a été suivie par la déprotection sélective des groupements hydroxyles primaires de l'intermédiaire formé. Globalement, le protocole développé à partir du N,O-bistriméthylsilylacétamide est plus efficace (**Figure 33**, rendement de 19% pour la voie **a-i** versus 52% pour la voie **a-ii**) pour obtenir le tréhalose-TMS₆ **7**.

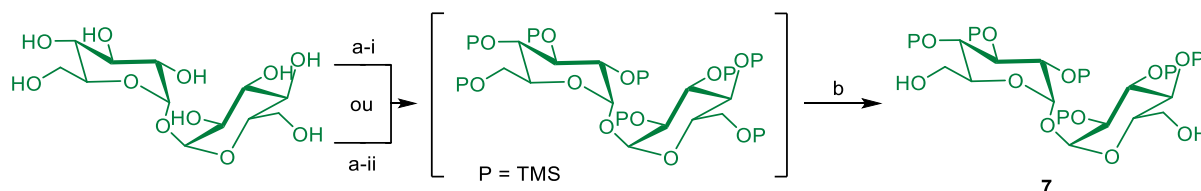


Figure 33. Schéma général de synthèse conduisant à l'obtention du tréhalose-TMS₆.

Réactifs et conditions : a-i) – TMSCl (12 éq.), NEt₃ (40 éq.), DCM anhydre, 15 h, 0 °C vers T.A. ; a-ii) – N,O-bis(triméthylsilyl)acétamide (8,6 éq.), TBAF (0,06 éq.), DMF anhydre, 15 h, T.A. ; b – K₂CO₃ (0,11 éq.), MeOH anhydre, 4 h, 0 °C, 52%.

Enfin, l'obtention du **GNL** désiré (**Figure 34**) a été effectué par le couplage du nucléolipide **6** au tréhalose protégé **7** au moyen d'une estérification de Steglich en présence de DCC et de DMAP comme catalyseur.

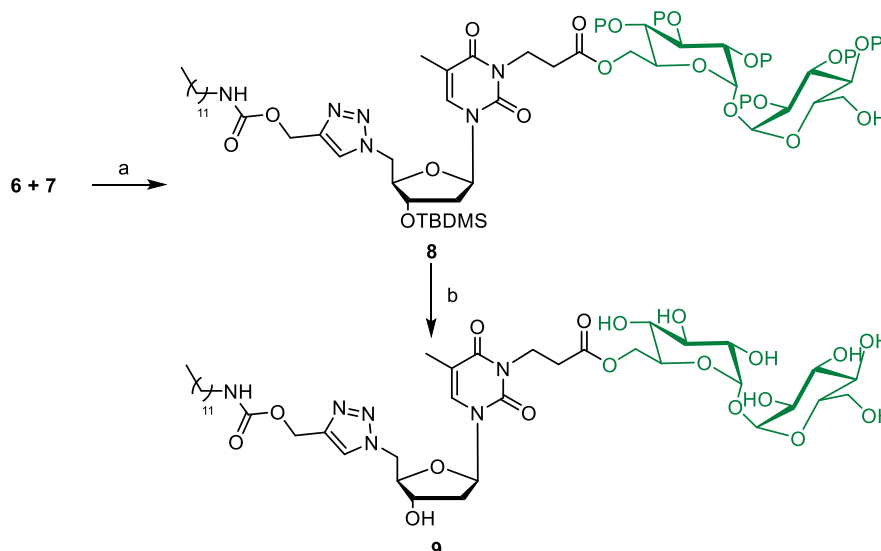


Figure 34. Étape de couplage conduisant à l'obtention des GNLs. *Réactifs et conditions : a – nucléolipide (1,5 éq.), DCC (1,5 éq.), DMAP (0,5 éq.), DCM anhydre, 16 h, RT, 41% ; b – Dowex 50WX2-100, MeOH anhydre, 15 min., T.A., 85%, puis TBAF (1 éq.), THF anhydre, 2h, 0 °C, 52%.*

Néanmoins, comme dit précédemment, l'utilisation du nucléolipide protégé en position 3' s'est avérée nécessaire pour le succès de la réaction. En effet, plusieurs tentatives effectuées avec un nucléolipide non protégé, n'ont permis que de récupérer la totalité du tréhalose engagé. Le **GNL** protégé **8** obtenu avec un rendement d'environ 41%, a ensuite été soumis à deux étapes

de déprotection afin de retirer les groupements silylés encore présents sur la molécule (TMS et TBDMS) pour obtenir le **GNL** final **9**.

Dans le but d'améliorer les rendements de l'estérification, une modification de la synthèse initiale a été envisagée (**Figure 35**).

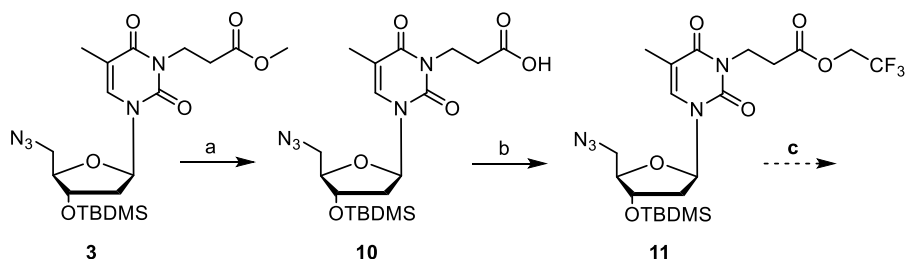


Figure 35. Estérification enzymatique. Réactifs et conditions : **a** – NaOH (1N) dans du méthanol anhydre, 1,4-dioxane anhydre, 6h, T.A., 81% ; **b** – 2,2,2-trifluoroéthanol (5 éq.), CAL-B (93 mg/mmol), tert-Butanol, μ -ondes, 1h., 46°C, 0% ; **c** – composé 7 (1 éq.), CAL-B (93 mg/mmol), tert-Butanol, μ -ondes, 1h., 46°C, 0%.

Dans une publication récente, Prabhakar *et al.* ont préparé des dérivés mono- et di-acyles du tréhalose de manière enzymatique [199]. Ce protocole a été adapté pour l'obtention du **GNL** en utilisant du 2,2,2-trifluoroéthanol en présence de la lipase *Candida antarctica* (CAL-B) dans du tert-butanol. Le dérivé 5'-azidothymidine **3** a préalablement été saponifié pour donner **10** avec un rendement de 81%. Il a ensuite été engagé dans la réaction suivante qui se déroule sous activation micro-ondes pendant 1h. Malheureusement, et malgré plusieurs tentatives, l'étape d'activation de l'ester n'a pas fonctionné.

1.1.2- Seconde voie de synthèse

Cette stratégie de synthèse (**Figure 29 bleue**) consiste à ajouter l'espaceur sur le tréhalose (et plus sur le nucléoside) avant couplage avec l'azote en position 3' de l'azidothymidine. Deux réactions ont été tentées. Dans la première, une estérification de Steglich du tréhalose-TMS₆ avec l'acide acrylique a été testée (**Figure 36-a**). Dans la seconde l'acide 3-bromopropionique a été utilisé (**Figure 36-b**). Cependant, le tréhalose n'a réagi dans aucun des deux cas.

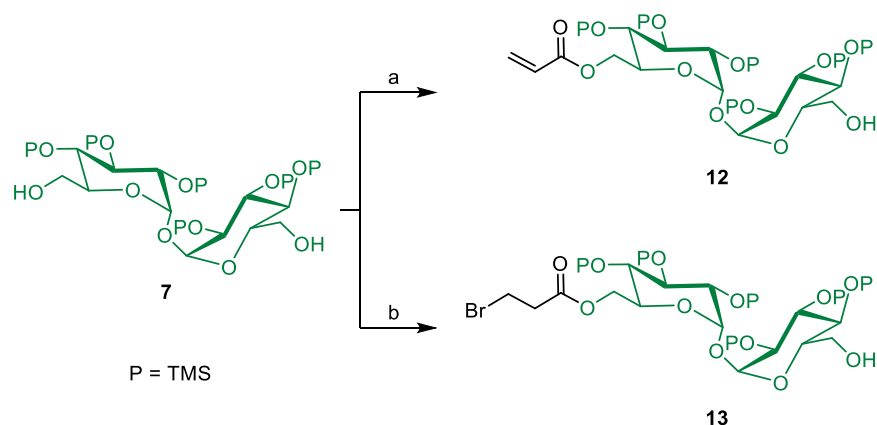


Figure 36. Étude de la voie de synthèse bleue. Réactifs et conditions : **a** – acide acrylique (1,5 éq.), DCC (1,5 éq.), DMAP (0,5 éq.), DCM anhydre, 16 h, T.A., 0% ; **b** – acide 3-bromopropionique (1,5 éq.), DCC (1,5 éq.), DMAP (0,5 éq.), DCM anhydre, 16 h, T.A., 0%.

Une autre approche consiste à fixer un groupe acryloyle sur le tréhalose per-silylé sélectivement déprotégé sur une de ses positions alcool primaire (tréhalose-TMS₇). Une telle déprotection s'effectue habituellement par méthanolyse acide ou basique du glucide considéré [200]. Dans le cas plus délicat présenté par le tréhalose, son dérivé hepta(triméthylsilylé) a pu être préparé dans la pyridine par l'addition équimolaire d'acide acétique à 5°C avec un rendement de 39% [201]. Bien plus récemment, Burek et Wandzik [202] ont décrit la synthèse d'hydrogels polymères de tréhalose dans laquelle, précisément, le 6-*O*-acryloyl- α,α' -D-tréhalose (que nous souhaitons utiliser) a été obtenu en 4 étapes (**Figure 37**).

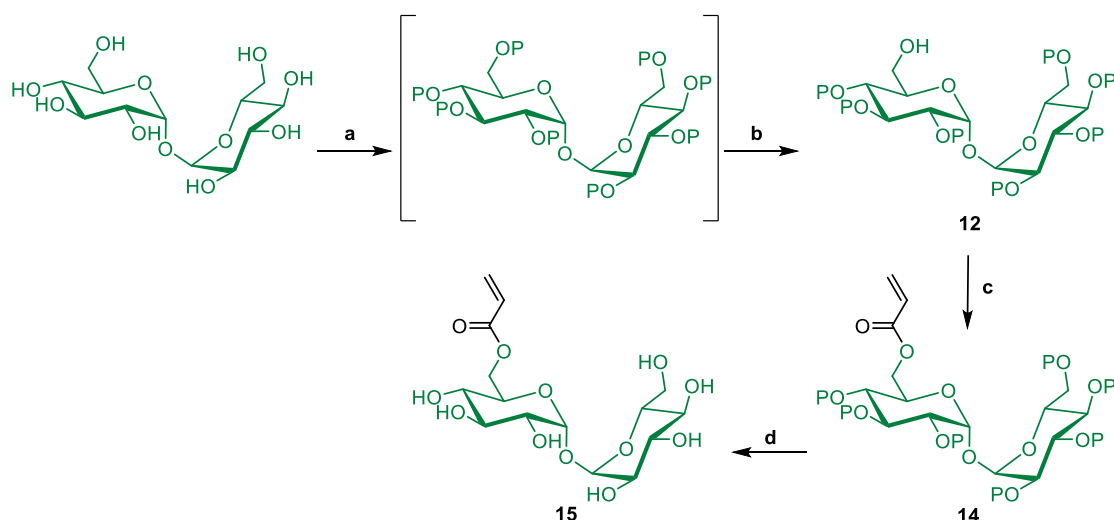


Figure 37. Étude de la voie de synthèse bleue. Réactifs et conditions : **a** – TMSCl (12 éq.), pyridine anhydre, 16 h, 0 °C vers T.A. ; **b** – K₂CO₃ (0,9 éq.), MeOH anhydre, 18 min., 0 °C, 32% ; **c** – chlorure d'acryloyle (1,5 éq.), Et₃N (2,2 éq.), DCM anhydre, 2 h, 0 °C vers T.A., 59% ; **d** – Dowex 50WX2-100, MeOH anhydre, 15 min., T.A., 98%.

Au cours de cette synthèse le tréhalose entièrement triméthylsilylé a été déprotégé spécifiquement sur une seule de ses deux positions primaires, par un traitement bref (18 minutes), avec une solution méthanolique de carbonate de potassium (une exposition plus prolongée de 120 minutes conduit par contre à la déprotection des deux positions). Le tréhalose-TMS₇ obtenu avec 47% de rendement a ensuite pu réagir avec du chlorure d'acryloyle (rendement de 74%) avant de subir une déprotection totale (rendement de 98%) en présence de résine acide échangeuse d'ions.

Pour notre part, et faute d'un nombre suffisant de tentatives, la réaction de mono-déprotection du tréhalose per-silylé n'a pu être optimisée comme désiré et le tréhalose-TMS₇ a été obtenu avec un rendement plus modeste de 32%, puis son dérivé acryloyle avec 59% de rendement. De plus, par manque de temps le couplage de ce nouveau composé au nucléolipide n'a pu être effectué mais cette voie de synthèse sera étudiée plus en détail dans le futur.

1.1.3- Synthèse d'un dérivé GNL-thymidine bicaténaire

En parallèle, nous avons débuté la synthèse d'un nouveau dérivé GNL bicaténaire à chaîne C18, développé à partir de la synthèse du GNL modèle. L'addition de deux chaînes lipidiques affectant la balance hydrophile-hydrophobe (HLB) permettra d'envisager un plus grand choix de nanotechnologies utilisables lors des tests de formulations. Dans une première

voie de synthèse, le substrat bicaténaire **18** a été obtenu en 3 étapes à partir du 1,2-diisopropylidène-*sn*-glycérol commercial, d'après les travaux de Latxague et collaborateurs [203], avec un rendement global de 44%. Il a ensuite été couplé par chimie click avec le dérivé azidothymidine **2** pour donner **19** avec 87% de rendement (**Figure 38**).

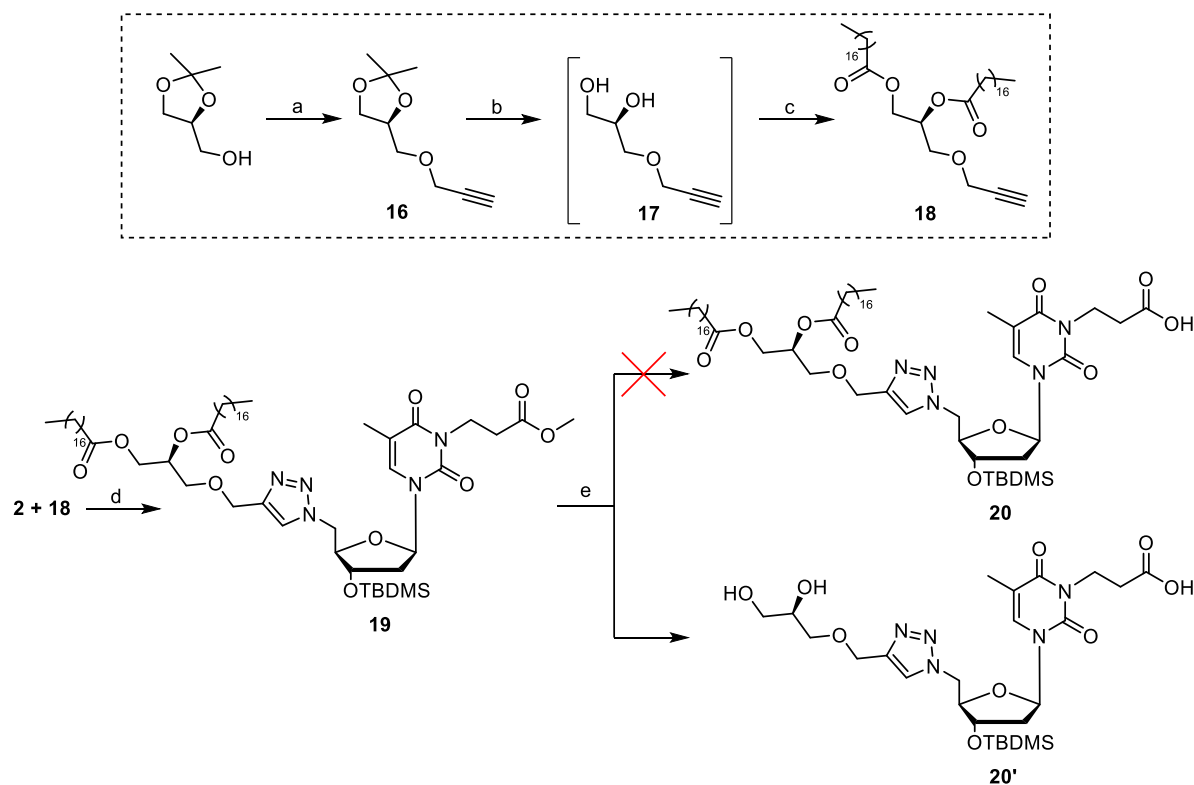


Figure 38. Première voie de synthèse étudiée pour l'obtention d'un GNL-thymidine bicaténaire. Réactifs et conditions : **a** – NaH 60 % (1,1 éq.), bromure de propargyle (1,1 éq.), toluène anhydre, 24 h, 0 °C vers T.A., 80% ; **b** – Dowex 50WX2-100, MeOH anhydre, 15 min., T.A., 79% ; **c** – Acide palmitique (2,5 éq.), DCC (2,5 éq.), DMAP (2,5 éq.), DCM anhydre, 24 h, T.A., 69% ; **d** – CuSO₄, 5H₂O (0,1 éq.), ascorbate de sodium (0,2 éq.), THF/H₂O (1 : 1), 15 h, 60 °C, 87% ; **e** – NaOH (1N) dans du méthanol anhydre, 1,4-dioxane anhydre, 15h, T.A.

L'étape suivante de saponification a été effectuée pour tenter de synthétiser l'acide correspondant **20**. Malheureusement les conditions de réaction ont dégradé le substrat (clivage des chaînes lipidiques pour donner **20'**). Dès lors, une seconde voie de synthèse a été envisagée et a permis cette fois de synthétiser avec succès le composé **20** à partir du nucléoside déjà saponifié **10** (**Figure 39**).

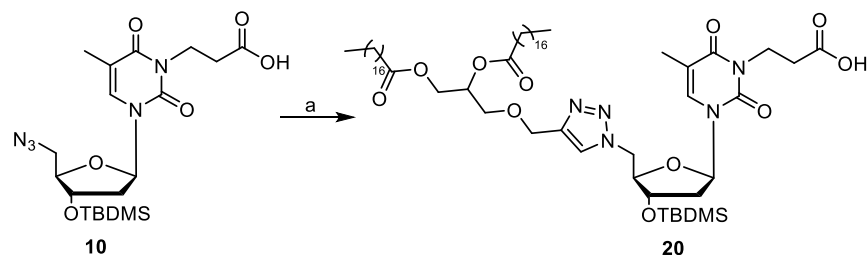


Figure 39. Seconde voie de synthèse étudiée pour l'obtention d'un GNL-thymidine bicaténaire. Réactifs et conditions : **a** – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 éq.), ascorbate de sodium (0,2 éq.), $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (1 : 1), 15 h, 60 °C, 76%.

Le couplage avec le tréhalose ainsi que les étapes de déprotection seront effectués ultérieurement afin d'obtenir et caractériser le GNL **22** (Figure 40).

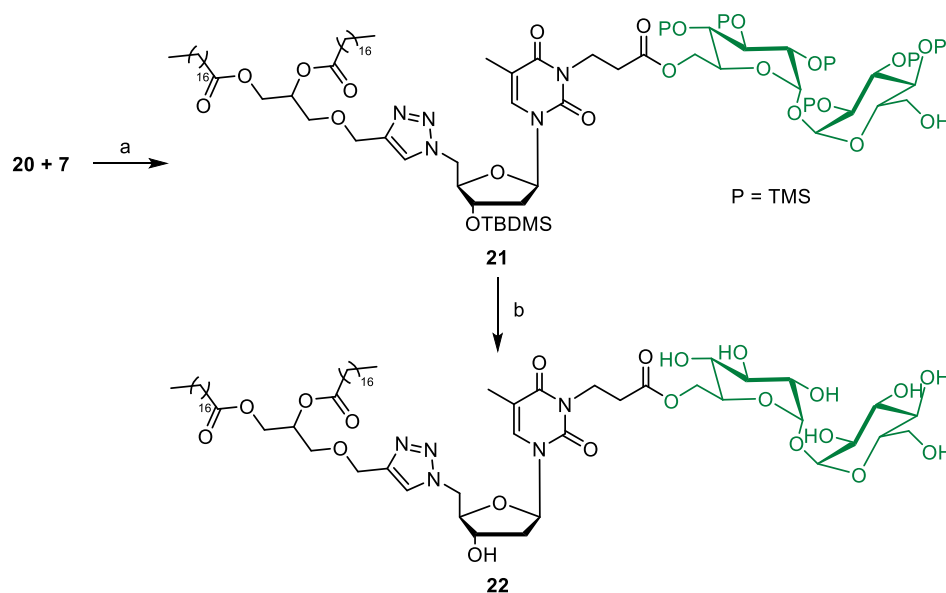


Figure 40. Étape de couplage conduisant à l'obtention du GNL thymidine bicaténaire. Réactifs et conditions : **a** – Nucléolipide (1,5 éq.), DCC (1,5 éq.), DMAP (0,5 éq.), DCM anhydre, 16 h, T.A. ; **b** – Dowex 50WX2-100, MeOH anhydre, 15 min., T.A., 85%, puis TBAF (1 éq.), THF anhydre, 2h, 0 °C.

1.1.4- Bilan intermédiaire et suite de la synthèse

En conclusion, nous avons synthétisé avec succès un premier **GNL** comportant une chaîne lipidique C12 et débuté celle d'un **GNL** comportant deux chaînes lipidiques C18 sur une base glycérol. La synthèse du **GNL C12 9** s'est avérée plus compliquée qu'escompté mais le composé a été obtenu avec un rendement global de 32%. Plusieurs voies de synthèses ont été écartées par manque de réactivité du tréhalose. Il a par ailleurs été déjà décrit dans la littérature qu'une mono- ou di-estérification du tréhalose peut être hasardeuse [199,204]. Dans la partie suivante ce problème a également été rencontré lors des tentatives de synthèse d'un tréhalose estérifié sur ses positions 6 et 6' par un nucléolipide.

1.2- Synthèse du Bis-GNL et de dérivés tréhalose-lipides

Ce tréhalose di-estérifié appelé Bis-GNL (**Figure 41**) s'inspire en effet de précédents composés développés au sein du laboratoire, les GlycoNucléoBolaAmphiphiles (GNBAs) qui s'auto-assemblent dans l'eau notamment pour former des hydrogels [205] (**Figure 41**). Ce **Bis-GNL** qui pourrait donc s'apparenter à un « GNBA inversé », se compose d'un tréhalose couplé à ses extrémités à deux unités nucléosidiques (**Figure 41B**). Il a été développé dans le but de fournir un composé susceptible d'être assez hydrophobe pour être inclus dans une nanoémulsion E/H qui aurait pu constituer un moyen supplémentaire de transport des composés tréhalose dans l'organisme, à côté des NPs.

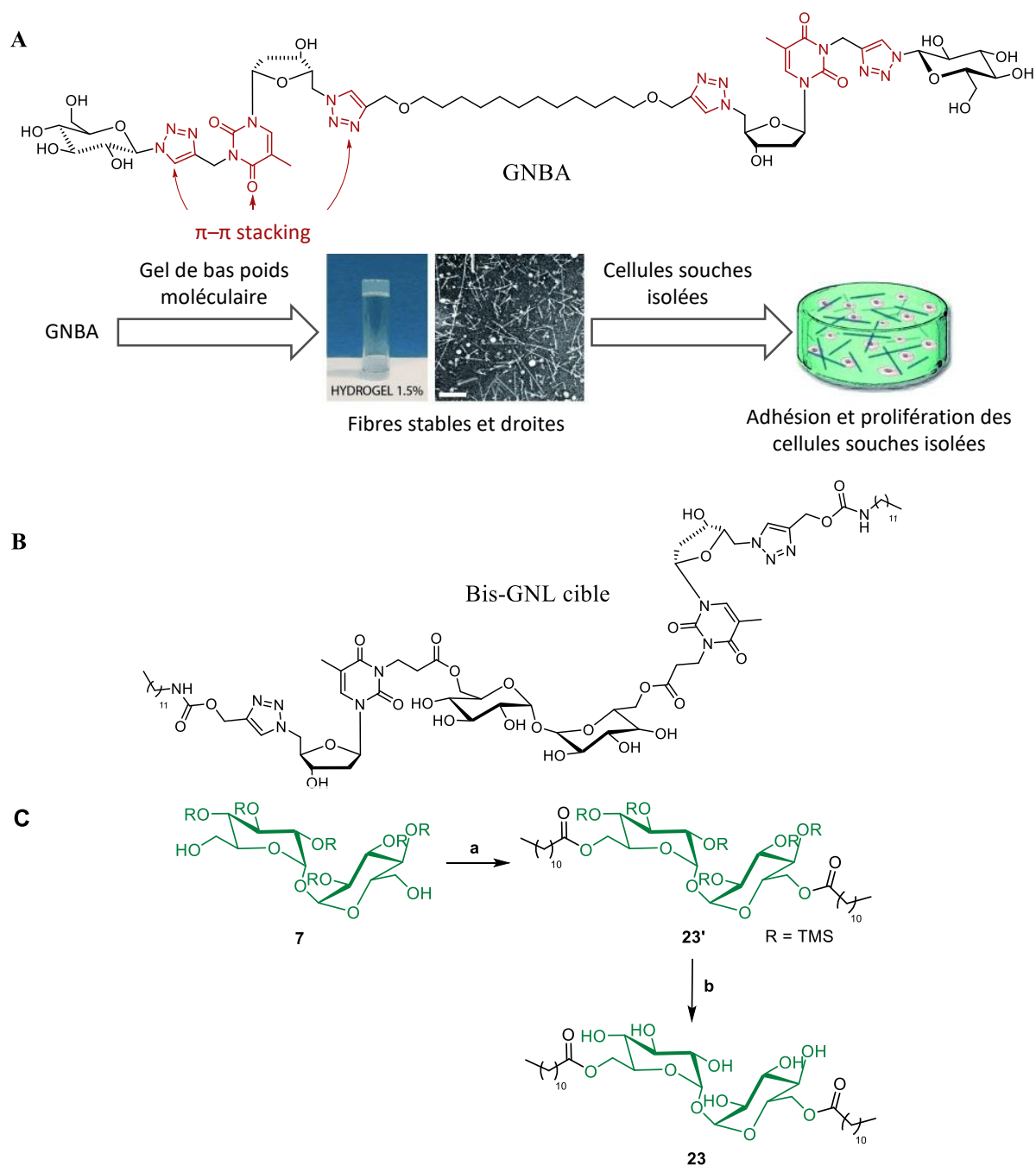


Figure 41. Développement de nouveaux composés. (A) Structure chimique d'un GNBA modèle, capable de s'auto-assembler en fibres et former un hydrogel pour diverses applications biologiques, d'après L. Latxague et al. [205]. (B) Structure chimique du Bis-GNL cible. (C) Synthèse d'un dérivé tréhalose-lipide. Réactifs et conditions : **a** – acide laurique (2 éq.) DCC (2 éq.), DMAP (0.5 éq.), DCM anhydre, 16 h, T.A., 86% ; **b** – Dowex 50WX2-100, MeOH anhydre, 30 min., T.A., 91%.

La stratégie de synthèse du **Bis-GNL** cible était identique à celle du composé **9**, mais en augmentant (> 2) le nombre d'équivalents d'unités nucléosidiques engagés dans la réaction.

Malgré de nombreuses tentatives, cette di-fonctionnalisation avec les NLs n'a jamais fonctionné malgré des augmentations de temps de réaction, de température ou d'équivalents de NLs et seul le **mono-GNL 9** est isolé en fin de réaction. Pourtant, la di-estérification sur les positions 6 et 6' du tréhalose par de « simples » chaînes d'acides gras est connue [206,207] et la synthèse par réaction de Steglich du tréhalose bi-lipidique C12 **dATr** (composé **23**, **Figure 41C**) a été conduite avec succès avec un très bon rendement, mais le même protocole n'est manifestement pas efficace avec des nucléolipides.

1.3- Synthèse des GNLs en série adénosine

À côté de la série de **GNLs** en série thymidine, il nous a semblé pertinent de nous intéresser également à des dérivés de type adénosine. En effet, l'adénosine est un neuromodulateur inhibiteur du SNC [208] qui agit par l'intermédiaire des récepteurs A₁ (A₁AR), A_{2A}, A_{2B} et A₃ co-localisés avec les récepteurs dopaminergiques D₁ et D₂. Il est communément admis que les récepteurs A₁AR jouent un rôle clé dans la neuroprotection, l'activation de A₁AR atténuant les lésions cérébrales, tandis que son blocage aggrave les lésions chez les animaux adultes [209]. L'adénosine possède également des effets neuroprotecteurs connus : couplée à un lipide (le squalène) elle a déjà montré tout son intérêt dans le traitement de traumatismes du SNC chez la souris [210]. L'inclusion de ce nucléoside dans la stratégie de conjugaison avec un lipide et avec le tréhalose a été envisagée. Le schéma rétrosynthétique suivant a donc été exploré (**Figure 42**) :

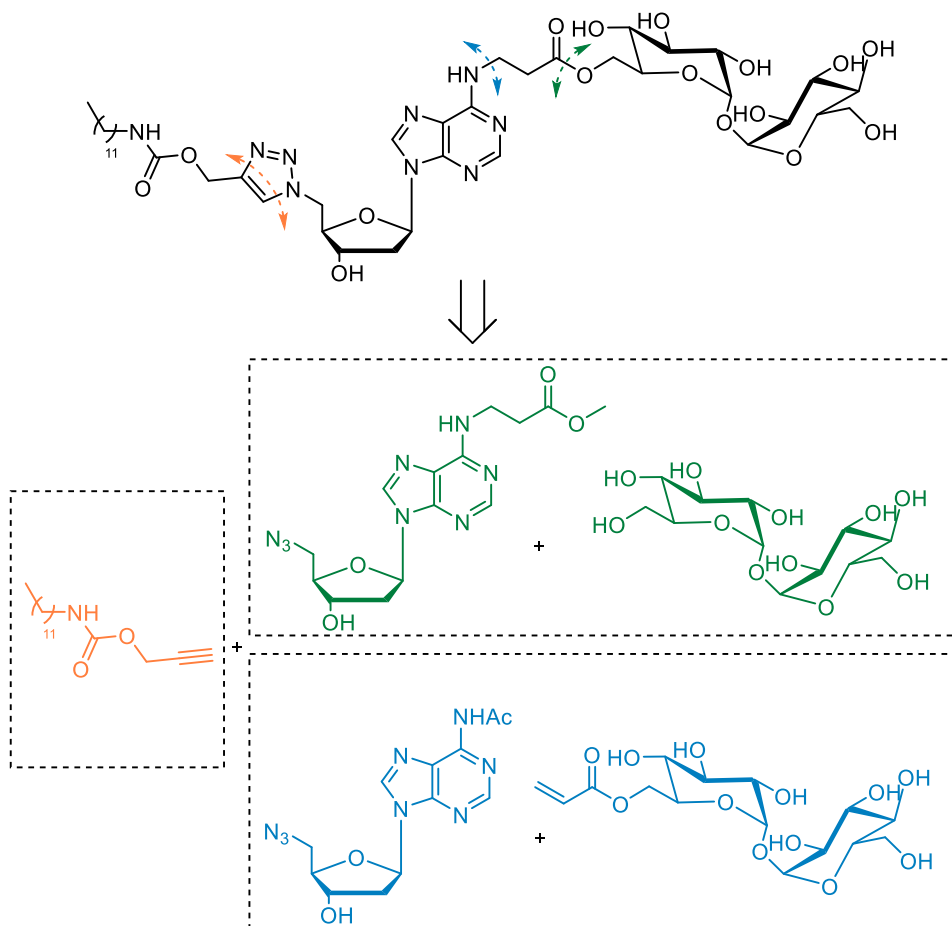


Figure 42. Schéma rétrosynthétique des GNLs en série adénosine. La première voie implique l'ajout du espaceur sur le nucléoside suivi de l'estérification avec le sucre (voie verte) et la seconde l'ajout du espaceur directement sur le tréhalose avant couplage (voie bleue). Pratiquement les tréhaloses utilisés seront un tréhalose-TMS₆ et un acryloyle tréhalose-TMS₇.

Quelle que soit la voie suivie, la partie lipidique (composé **4**) demeure liée au nucléoside par chimie click, mais deux possibilités sont envisageables pour lier le sucre au nucléoside (disjonctions bleue ou verte). L'une d'elles revient à faire réagir un tréhalose-TMS₆ (dont un seul hydroxyméthyle était fonctionnalisable) sur un résidu ester du nucléoside. L'autre possibilité réalise l'inverse, à savoir lier le nucléoside à un résidu acryloyle d'un tréhalose-TMS₇.

1.3.1- Première voie de synthèse

À l'instar des dérivés de la thymidine (voir le Chapitre VI-1.1) le même lien ester a été utilisé entre le tréhalose et la base nucléique. Pour cela, le groupe amino en position 6 de l'adénine a été utilisé comme suit pour la synthèse du dérivé azoture (Figure 43).

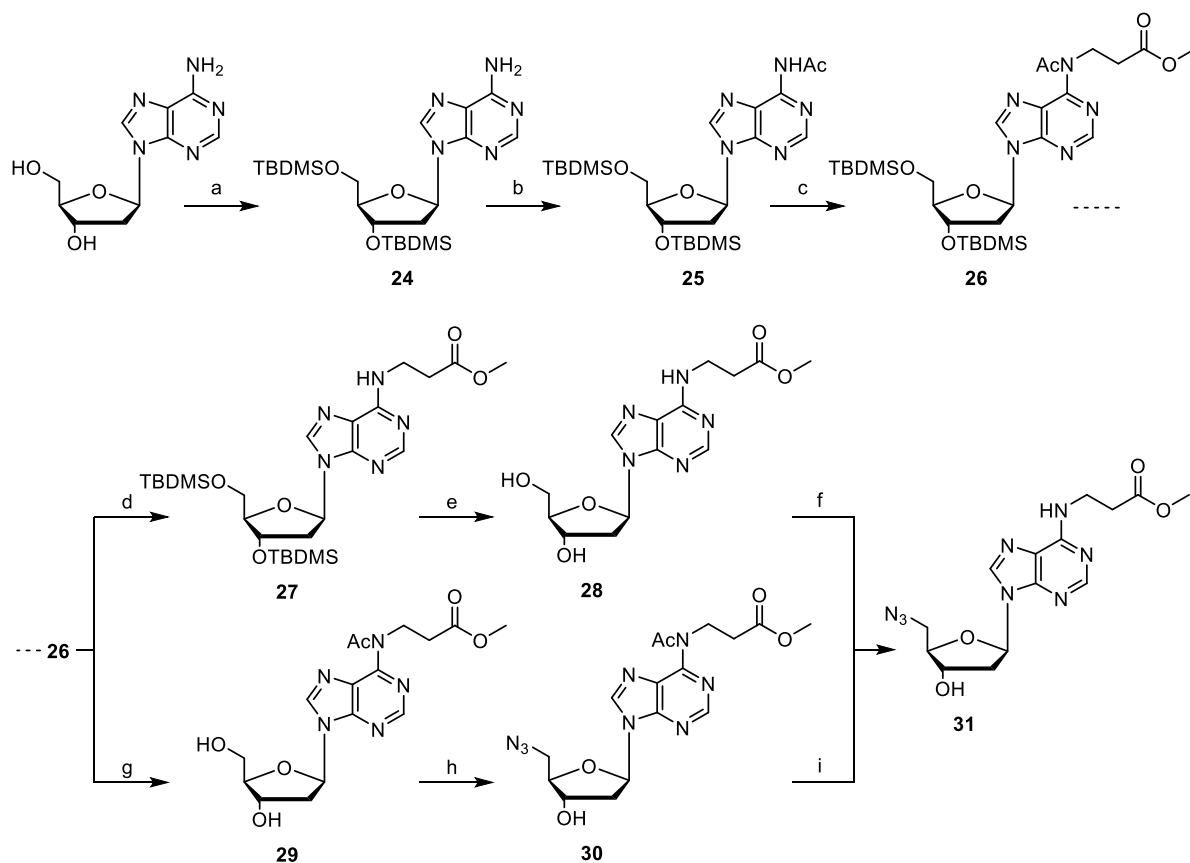


Figure 43. Schéma général de synthèse conduisant à l'obtention des parties nucléolipidiques en série adénosine. Réactifs et conditions : *a* – TBDMSCl (2 éq.), imidazole (3 éq.), DMF anhydre, 15 h, T.A., 93% ; *b* – Ac₂O (10 ml), pyridine anhydre, 24 h, 80 °C puis imidazole (0,8 éq.), MeOH, 24 h, T.A., 91% ; *c* – DBU (1,55 éq.), acrylate de méthyle (1,55 éq.), DMF anhydre, 20 h, T.A., 77% ; *d* – NH₃ 7M, MeOH, 48 h, T.A., 79% ; *e* – TBAF (2,2 éq.) 1M, THF, 2 h, T.A. ; *f* – PPh₃ (1,2 éq.), NaN₃ (5 éq.), CBr₄ (1,2 éq.), DMF anhydre, 24 h, T.A. ; *g* – TBAF (2,2 éq.) 1M, THF, 2 h, T.A., 91% ; *h* – PPh₃ (1,2 éq.), NaN₃ (5 éq.), CBr₄ (1,2 éq.), DMF anhydre, 24 h, T.A., 69% ; *i* – NH₃ 7M, MeOH, 48 h, T.A..

La 2-désoxyadénosine commerciale a tout d'abord été séchée azeotropiquement en présence de toluène avant protection de la partie ribose au moyen de *tert*-butyldiméthylchlorosilane et d'imidazole dans le DMF. Le produit **24** résultant a été obtenu pur après recristallisation dans l'hexane avec des rendements > 90% et a pu être préparé à l'avance en grandes quantités. Le composé **25** a quant à lui été obtenu en deux étapes par N-désacétylation sélective du composé intermédiaire diacétylé **25'**, une réaction mise en évidence par Tararov *et al.* [211] sur de l'adénosine pentaacétylée et mise en application avec succès au dérivé bis-silylé **24** (Figure 44).

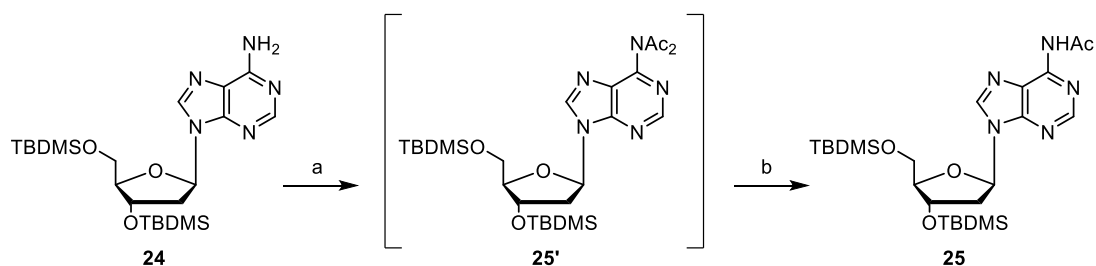


Figure 44. Mono-protection de l'adénine. Réactifs et conditions : **a** – Ac₂O (10 ml), pyridine anhydre, 24 h, 80 °C ; **b** –imidazole (0,8 éq), MeOH, 24 h, T.A., 91%.

Le composé **25'** était stable et a pu être isolé, même si la plupart du temps il a été directement réutilisé pour la réaction suivante qui a permis d'obtenir le composé **25** de façon quantitative, et utilisable sans purification dans la suite de la synthèse. Comme en série thymidine, une addition de Michael de **25** en milieu basique (DBU dans le DMF) sur l'acrylate de méthyle a permis d'obtenir **26** (70-90%) (**Figure 45**), tandis que l'utilisation alternative (décrite par Tararov *et al.*) de dérivés halogénés (ici le 3-bromopropionate de méthyle) en présence de DBU ou de K₂CO₃ n'a par contre jamais conduit au produit **26** attendu.

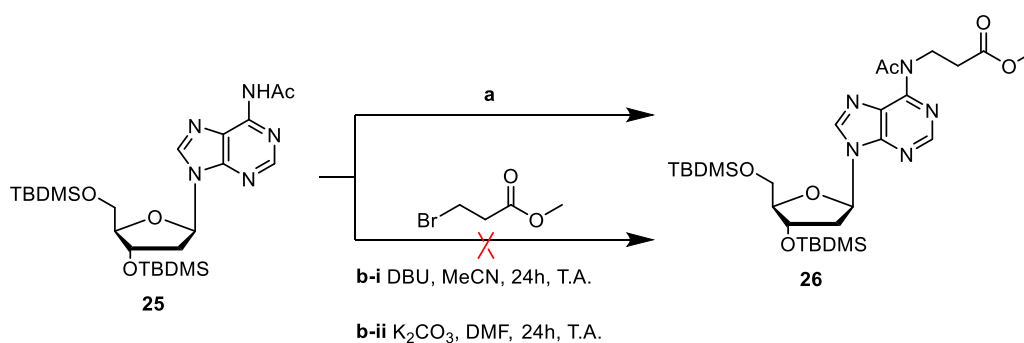


Figure 45. Les différentes voies de synthèse étudiées pour l'ajout de l'espaceur. Réactifs et conditions : **a** – DBU (1,55 éq.), acrylate de méthyle (1,55 éq.), DMF anhydre, 20 h, T.A., 77% ; **b** – Ces réactions faisant appel à l'utilisation du 3-bromopropionate de méthyle n'ont pas conduit au produit désiré.

L'ammoniolysé du composé **26** a été effectuée dans une solution d'ammoniac concentré pour donner le composé **27** avec un rendement de 80%. La déprotection classique des groupes tertibutyldiméthylsilyloxy au moyen de TBAF dans le THF s'est par contre soldée par une purification très complexe. Le composé **28** a effectivement été obtenu (**Figure 46**) mais contaminé par un produit secondaire dont il a été impossible de le séparer.

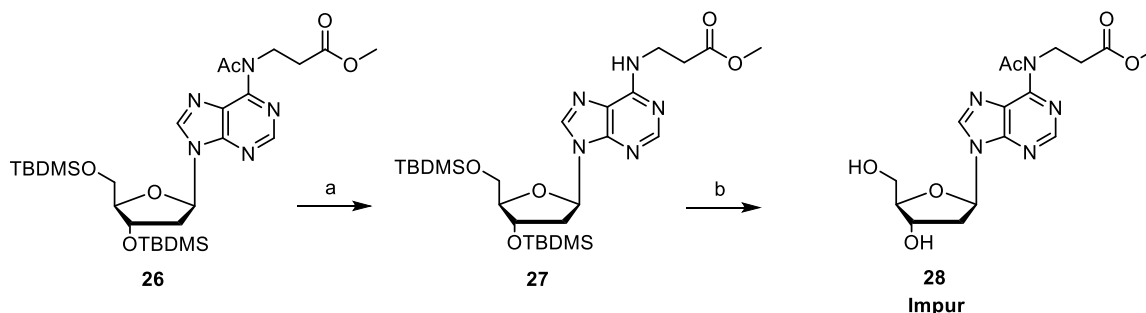


Figure 46. Les premières voies de synthèse étudiées pour la déprotection. Réactifs et conditions : **a** – NH_3 7M, MeOH, 48 h, T.A., 79% ; **b** – TBAF (2,2 éq.) 1M, THF, 2 h, T.A..

Curieusement, la déprotection anticipée des groupements silylés effectuée directement à partir de **26** a fourni le composé **29** avec d'excellents rendements (80-90%). Ce contraste entre deux réactions identiques avec deux composés très similaires sera abordé plus en détails au paragraphe suivant. Le composé **29** a ensuite été soumis à une réaction d'Appel suivie d'une réaction d'azidation pour conduire au composé **30** (50-70%) avec, comme en série thymidine, une attention particulière à apporter à la qualité de la triphénylphosphine utilisée dont la pureté constitue un paramètre clé dans la réussite de cette étape (**Figure 47**).

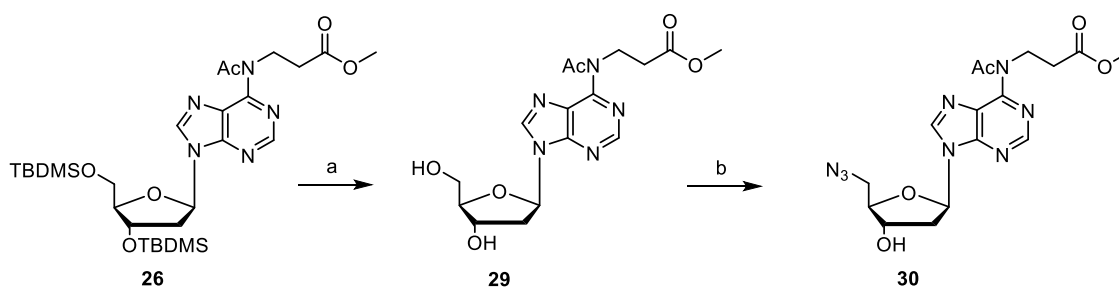


Figure 47. Les premières voies de synthèse étudiées pour la déprotection. Réactifs et conditions : **a** – TBAF (2,2 éq.) 1M, THF, 2 h, T.A., 91% ; **b** – PPh_3 (1,2 éq.), NaN_3 (5 éq.), CBr_4 (1,2 éq.), DMF anhydre, 24 h, T.A., 69%.

Il peut être intéressant de rapporter ici qu'au cours d'un précédent essai le composé **31** attendu n'a pas pu être isolé contrairement à l'acide correspondant **31'** obtenu avec 73% de rendement : la désacétylation prévue (et par ailleurs obtenue) en position N^6 s'est aussi accompagnée d'une hydrolyse inattendue de l'ester (**Figure 48**), résultat confirmé à la fois en infrarouge et par spectrométrie de masse (HRMS).

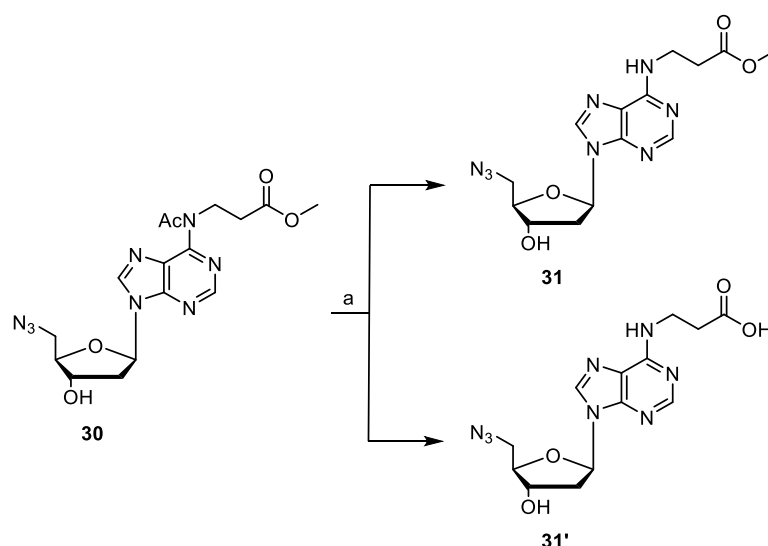


Figure 48. Les premières voies de synthèses étudiées pour la déprotection. Réactifs et conditions : **a** – NH_3 7M, MeOH, 48 h, T.A., 73%.

La solution méthanolique commerciale d'ammoniac 7M doit non seulement être conservée à +4°C mais elle est également hygroscopique. Ce dernier point n'était pas alertant dans un premier temps puisque, les désacétylations de **26** ou de **30** effectuées avec succès (i.e. sans hydrolyse de l'ester) avaient été conduites peu de temps après réception de la solution d'ammoniac. *A contrario*, la désacétylation problématique de **30** (avec cette fois hydrolyse de l'ester pour donner **31'**) a été effectuée avec la même solution de réactif mais beaucoup plus tard, ce qui a pu laisser supposer que la solution ammoniacale s'était au fil du temps partiellement hydrolysée avec présence probable d'ions hydroxydes pouvant avoir provoqué l'hydrolyse constatée de l'ester **30**. Pourtant, des essais ultérieurs effectués avec une solution commerciale neuve (provenant d'un fournisseur différent) n'a d'une part jamais conduit à une réaction totale, mais a également donné l'acide **31'**. Nous n'avons donc pas pu lever le voile sur ce constat paradoxal et d'autres essais seront sans doute nécessaires.

1.3.2- Déprotection des groupes silylés

Comme nous l'avons évoqué précédemment, contre toute attente de nombreuses difficultés ont été rencontrées au cours de l'étape de déprotection des groupes TBDMS (*tert*-butyldiméthylsilyles) au moyen du classique TBAF (fluorure de tétrabutylammonium). (**BOX 3**). Toutes les voies de synthèse envisagées des analogues adénosine ont fait appel à la réaction générale suivante pour laquelle les groupes R et R' varient en fonction du schéma suivi (**Figure 49**).

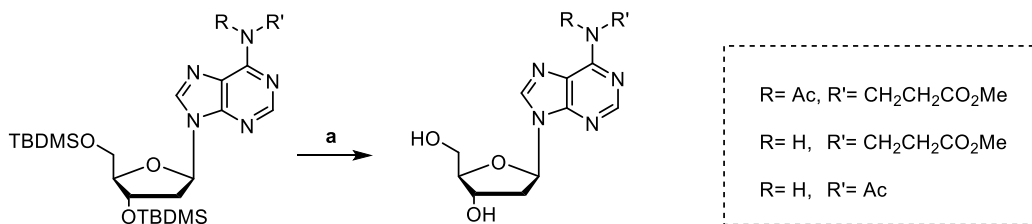
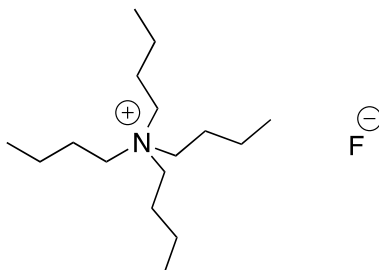


Figure 49. Réaction générique de déprotection des dérivés adénosine. Réactifs et conditions
 : *a* – TBAF (2,2 éq.) 1M, THF, 2 h, T.A..

Quelle que soit la nature des groupes R et R' la déprotection de la partie ribose a été effectuée en 2 heures à température ambiante (vérification faite par CCM) au moyen d'une solution molaire de TBAF dans le THF en léger excès (+10% par rapport à chaque TBDMS). En croisant les différents résultats obtenus il est apparu évident que c'était l'étape de purification qui présentait dans certains cas des difficultés. Le TBAF est en effet un sel lipophile : c'est un composé amphiphile à la fois soluble en phase aqueuse et en phase organique (propriétés de transfert de phase des sels de tétraalkylammonium). Usuellement une extraction liquide-liquide de la phase aqueuse permet d'éliminer le TBAF en excès et/ou les produits secondaires issus du TBAF (formés par ailleurs en quantités stœchiométriques).

BOX 3 : Déprotection d'éther de silyle au moyen de TBAF

La déprotection des groupes silylés, dont le TBDMS ($t\text{BuSiMe}_2$) est l'un des plus utilisés, s'effectue typiquement au moyen de sources d'ions fluorures comme le TBAF (fluorure de tétrabutylammonium $n\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$) généralement utilisé en première intention et popularisé par Corey *et al.* au début des années 70 [212].



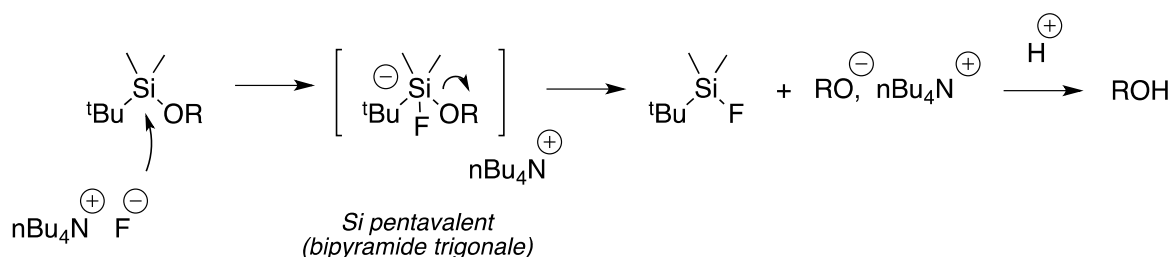
Structure du TBAF (fluorure de tétrabutylammonium $n\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$)

La plus grande affinité du fluor pour le silicium par rapport à l'oxygène se traduit par une énergie de liaison Si-F plus élevée de $214 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ par rapport à la liaison Si-O (cf. Tableau) ce qui constitue la force motrice de la réaction.

Données physiques comparées Si, O, C. ^a Échelle de Pauling, ^b Valeurs moyennes. D'après J. Clayden *et al.* [213].

Électronégativité ^a		Énergie de liaison ($\text{Kj}\cdot\text{mol}^{-1}$) ^b		Longueur de liaison (nm)	
F	4,0	Si-F	582	Si-C	192
O	3,5	Si-O	368	C-C	154
Si	2,5	-	-	-	-

Le mécanisme est une substitution nucléophile de type 2 (SN2) particulière. Il se produit une attaque directe de l'anion fluorure sur le silicium (pourtant très encombré) du groupe TBDMS ce qui ne serait pas envisageable en série carbonée. Ici, la longueur de la liaison Si-C (cf. Tableau) diminue la contrainte stérique d'une part, et l'existence sur le silicium d'orbitales **d** vacantes de basse énergie d'autre part, facilite l'attaque du nucléophile (**Figure ci-dessous**).



Mécanisme de déprotection par le TBAF.

Un intermédiaire silylé pentavalent chargé négativement est ainsi obtenu, celui-ci élimine ensuite le résidu alcoolate.

Néanmoins, lorsque le produit déprotégé s'avère trop soluble en phase aqueuse, ce protocole n'est plus applicable [214]. La lipophilie du TBAF (ou de ses résidus) entre alors en jeu car le produit d'intérêt doit pouvoir être idéalement isolé sans co-élution avec les sels de tétrabutylammonium. Ces sels, indétectables en CCM sont par contre clairement reconnaissables en RMN du proton (**Figure 50**) donc *a posteriori* seulement. Dans cet exemple (composé **28** avec R= H, R'= CH₂CH₂CO₂Me) l'éluant choisi lors de la purification sur colonne de silice flash (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) a entraîné la co-élution du produit désiré avec les sels de tétrabutylammonium.

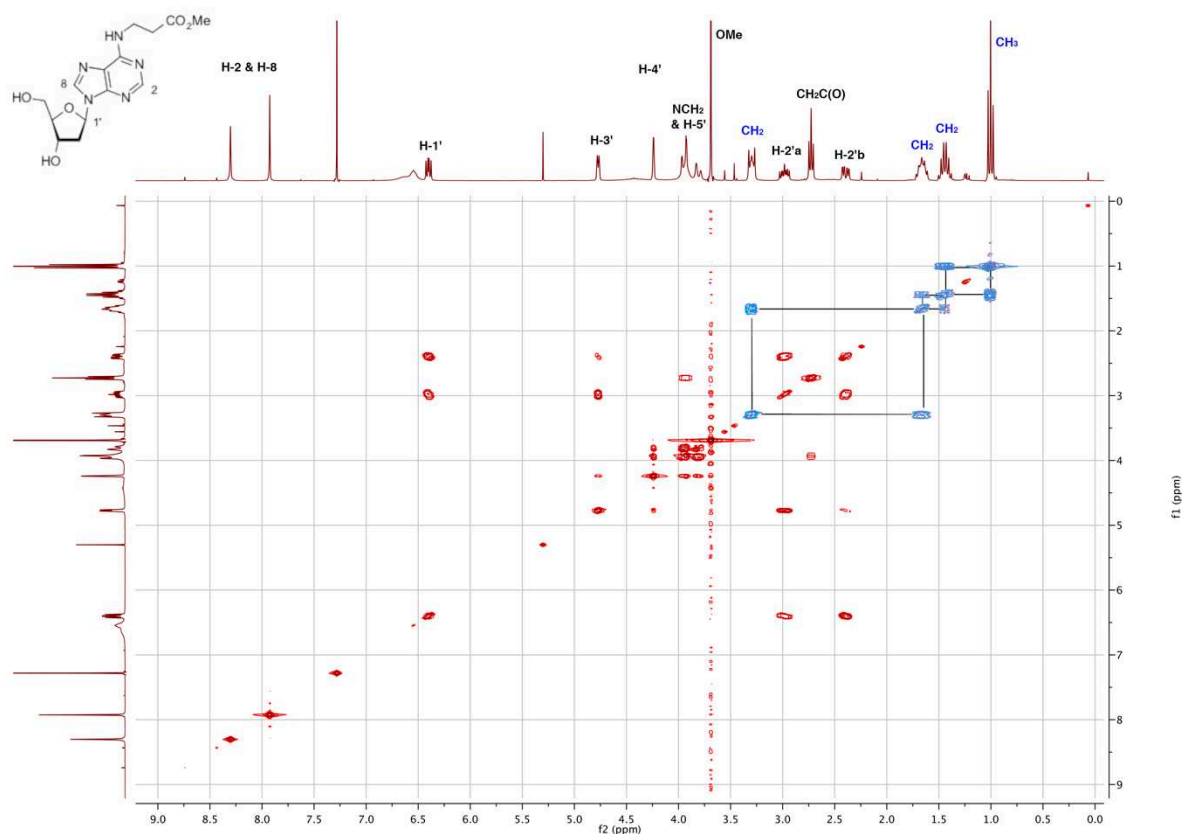


Figure 50. Spectre RMN du composé **28**. Spectre COSY du N⁶- [(méthoxycarbonyl)éthyl] -2'-désoxyadénosine **28** (rouge) et des chaînes butyles (bleu) sans corrélation entre les deux sous-spectres : t, 1.00 ppm, 3H ; sext., 1.38-1.48 ppm, 2H ; m, 1.61-1.72 ppm, 2H ; m, 3.27-3.28 ppm, 2H pour la chaîne butyle.

Partant d'un analogue *a priori* légèrement moins polaire (composé **26** avec R= Ac, R'= CH₂CH₂CO₂Me) un gradient de solvant (cette fois AcOEt/MeOH 99:1 jusqu'à 95:5) a par contre permis d'isoler une majeure partie de fractions pures du produit désiré avec des rendements de 85-90% comme décrit précédemment (composé **29**).

A contrario, avec R= H et R'= Ac (composé **32**) le même gradient n'a pas permis d'isoler une fraction pure, le produit était en effet plus polaire et la co-élution avec les sels de tétrabutylammonium s'est avérée inévitable. Un changement d'éluant a pourtant permis d'améliorer la purification mais au prix de manipulations fastidieuses et/ou peu répétables. Ainsi, avec un gradient DCM/MeOH 99:1 jusqu'à 95:5, les fractions pures se sont révélées à la faveur de l'évaporation lente du solvant au cours de la chromatographie par un dépôt solide du produit le long de la paroi des tubes. Si, en dépit d'une CCM qui semblait indiquer qu'il y avait toujours du produit, ce dépôt spontané ne se produisait pas, alors les fractions concernées commençaient en fait à être contaminées par les sels de tétrabutylammonium. Au cours d'une autre expérience le produit désiré **32** a cristallisé lentement dans un flacon fermé du mélange dans DCM/MeOH 97:3, en dépit d'une co-élution avec les sels d'ammonium. L'isolement répété sur verre fritté du solide cristallisé n'a cependant permis de recueillir que 43% de produit pur.

Afin de diminuer la polarité du produit final dans l'espoir de faciliter l'étape de séparation chromatographique, le dérivé di-acétylé (R= R'= Ac) a été soumis à la déprotection au TBAF. Après purification sur colonne de silice (AcOEt/MeOH 99:1 puis 98:2) les fractions contenant le produit ont été concentrées par lots de 20 tubes de 12 ml. La RMN du proton a permis de confirmer la pureté des 4 premiers lots, mais le cinquième contenait déjà 27% de sels d'ammonium, le sixième 57% et le septième 78%. La co-élution prédominait donc rapidement malgré la faible polarité de l'éluant utilisé et les fractions pures ne représentaient que 20% de rendement. La di-acétylation de l'azote exocyclique n'a donc pas eu l'effet escompté, ce que nous avons compris après analyse du produit isolé : la déprotection des groupes silylés par le TBAF s'est également accompagnée d'une déprotection partielle du substrat di-acétylé qui a en fait été isolé uniquement sous la forme mono-acétylée plus polaire (R= H, R'= Ac) c'est-à-dire le composé **32** déjà rencontré.

Ce résultat qui n'avait pas été anticipé peut pourtant s'expliquer simplement. Le second groupe acétyle est en effet labile en milieu basique (par traitement à l'imidazole dans le méthanol comme montré précédemment). Or, l'ion fluorure est intrinsèquement très basique [215] et les solutions commerciales de TBAF contiennent toutes une faible proportion d'eau variable selon les lots [216], ce qui génère également des ions hydroxydes en présence de fluorure [217]. De nombreux auteurs compensent d'ailleurs cet inconvénient (lorsque c'en est un) en ajoutant au milieu réactionnel des quantités variables d'acide acétique [218] afin d'opérer en conditions neutres, ce qui n'a pas été tenté ici. La recherche de solutions alternatives

au TBAF a été privilégiée dans le cas précis des composés difficilement séparables des sels de tétrabutylammonium. Mais ni l'utilisation de CBr_4 [219], d'AcCl catalytique [220], d'iodure de poly(vinylpyrrolidone) PVP-I [221], d'iode dans le méthanol ou d'acide sulfonique (le CSA en l'occurrence) [222] n'ont donné satisfaction (dégradation du substrat, peu ou pas de réaction).

Enfin, l'utilisation de fluorure d'ammonium en excès dans le méthanol à 60°C a été testé [223]. La déprotection du composé monoacétylé **25** ($\text{R} = \text{Ac}$, $\text{R}' = \text{H}$) s'est effectuée de façon très propre en CCM, avec disparition progressive du spot du réactif au profit du produit monosilylé (déprotection du OTBDMS primaire) puis du produit entièrement déprotégé à R_f bien plus bas ce qui a permis une séparation aisée sur colonne de silice, même si la réaction n'était pas tout à fait complète au moment de l'arrêt. Cependant, après analyse il est apparu que le traitement au fluorure d'ammonium a également enlevé l'acétyle en position N^6 de l'adénine pourtant plus difficile à éliminer (pour rappel NH_3 7M vs imidazole pour le premier acétyle).

Nous avons pensé tirer profit de cette double propriété de NH_4F (déprotection TBDMS combinée à une N^6 -désacétylation) pour passer directement de **26** à **28** en simplifiant d'une étape le schéma général envisagé. Malheureusement, la désacétylation n'a cette fois-ci pas eu lieu et c'est le composé **29** (18%) qui a été isolé (**Figure 51**) :

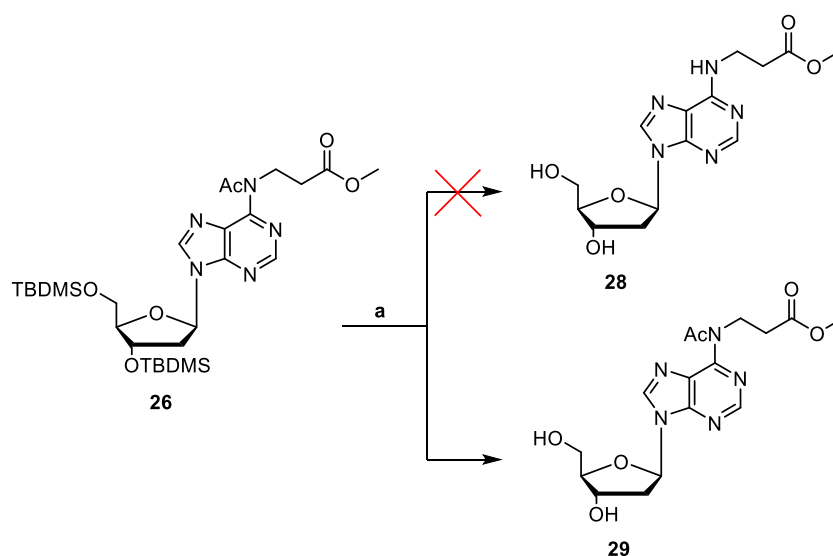


Figure 51. Tentative de désacétylation. Réactifs et conditions : a – NH_4F , MeOH , 6h, 60°C .

1.3.3- Deuxième voie de synthèse

La synthèse de la partie nucléosidique peut se schématiser comme suit (**Figure 52**).

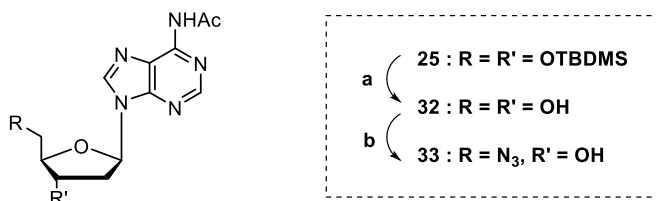


Figure 52. Schéma récapitulatif de la synthèse de la partie nucléosidique. Réactifs et conditions : **a** – TBAF (2,2 éq.) 1M, THF, 2 h, T.A. ; **b** – PPh₃ (1,2 éq.), NaN₃ (5 éq.), CBr₄ (1,2 éq.), DMF anhydre, 24 h, T.A.

Elle s'effectue à partir du dérivé monoacétylé **25** déjà décrit. Comme préalablement mentionné, l'utilisation de fluorure d'ammonium de prime abord plus séduisante a malheureusement entraîné la désacétylation du produit en plus de la déprotection des deux groupes silyles. La déprotection au TBAF a été conservée malgré son faible rendement immédiat. Le composé **32** résultant a ensuite été soumis à une bromation (réaction d'Appel) suivie d'une substitution *in situ* de l'halogène par l'anion azoture. Malheureusement cette dernière étape s'est avérée décevante en fournissant le composé **33** avec des rendements médiocres variant de 11 à 15%.

1.3.4- Bilan intermédiaire et suite de la synthèse

Parmi les deux voies de synthèse explorées, il sera nécessaire de confirmer si la réaction d'Appel est peu compatible avec la présence d'un proton sur l'azote 6 de l'adénosine (composé **33**, voie de synthèse 2) ou s'il s'agissait d'un problème de manipulation et/ou de pureté des réactifs (PPh₃ en particulier). Il restera ensuite à valider le couplage entre le composé **33** et l'acryloyl-tréhalose-TMS₇. Concernant la première voie de synthèse, le composé clé **31** a été obtenu avec succès à condition d'effectuer la déprotection silylée au TBAF sur un intermédiaire suffisamment lipophile (R= Ac, R'= CH₂CH₂CO₂Me) afin de ne pas compliquer la purification ultérieure. Malheureusement, l'obtention de l'acide **31'** lors de la désacétylation du composé **30** a contrarié notre stratégie de synthèse et continue de poser problème. Quoiqu'il en soit ce résultat resterait exploitable à condition d'envisager :

- (1) de clicker le dérivé lipidique précurseur **4** sur l'acide **31'** préalablement protégé en position 3' sur le ribose (composé **34'**) ce que nous n'avons pas encore eu l'occasion de tenter,
- (2) d'estérifier le NL **35** obtenu (s'il est effectivement obtenu) avec le dérivé tréhalose-TMS₆ (**Figure 53**).

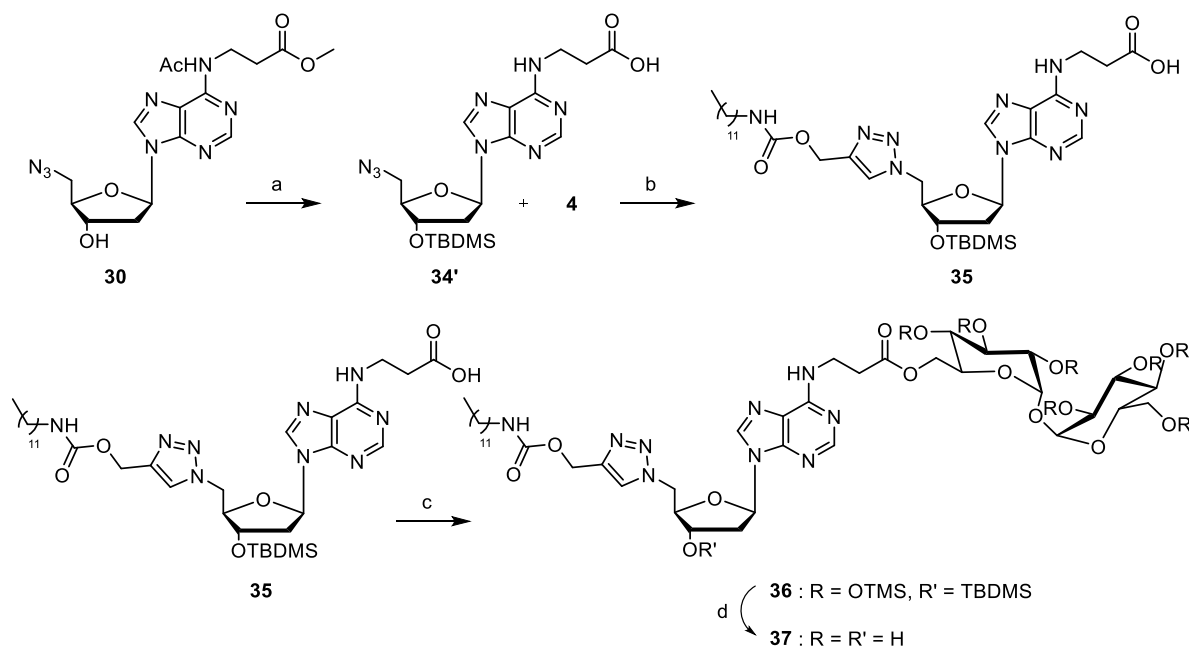


Figure 53. Futures étapes de couplage pour obtenir le nucléolipide et le GNL. Réactifs et conditions : **a** – TBDMSCl (1,2 éq.), imidazole (1,2 éq.), DMF, 12 h, T.A. puis NH₃/MeOH (7M) ; **b** – composé 4 (1 éq.), CuSO₄ (0,1 éq.), ascorbate de sodium (0,2 éq.), H₂O/THF, 4h, 60°C ; **c** – composé 12 (1 éq.), DCC (1,5 éq.), DMAP (0,5 éq.), DCM, 6 h, T.A.. ; **d** – TBAF 1M, THF, 2 h, T.A..

1.4- Conclusion et perspectives

La synthèse de deux séries, thymidine et adénosine, a été étudiée pour le développement des GNLs. Dans un premier temps, malgré la difficulté de couplage entre le nucléolipide et le tréhalose, la synthèse d'un GNL modèle à base de thymidine a été effectuée avec succès. À partir de cette première voie de synthèse, et inspiré du GNBA (molécule décrite dans le Chapitre VI-1.2), l'obtention d'un nouveau composé appelé Bis-GNL, comportant deux unités nucléolipidiques, a également été étudiée. Néanmoins, cette voie n'a pas abouti, probablement dû à l'encombrement stérique des nucléolipides. À long terme, il serait donc intéressant de développer cette voie de synthèse, car cet analogue du GNBA pourrait posséder des propriétés

d'auto-assemblage singulières [205]. Dans un second temps, dans l'optique d'utiliser les propriétés biologiques de l'adénosine [208–210], la synthèse d'un second mono-GNL a été entreprise, elle pose plus de difficultés et demeure toujours en cours d'étude. Enfin, un dérivé du tréhalose, appelé **dATr** pour diacycle-tréhalose, a été obtenu pour servir de contrôle lors des tests de formulation.

2- Formulation et caractérisation physico-chimique des nanovecteurs

Comme exposé précédemment dans le Chapitre IV, les dérivés nucléolipides, outre leur grande variété de propriétés biologiques [154,159,160,163], ont la capacité de former des assemblages supramoléculaires tels que des micelles, liposomes ou SLNs [166–170]. Dès lors, la possibilité de formuler le **GNL**-thymidine que nous avons synthétisé à l'intérieur de NPs de PLGA ou sous forme de nanoparticules solides lipidiques constitue la suite logique de notre travail.

En effet, dans l'optique d'une application pour le traitement des maladies neurodégénératives (en particulier la maladie de Parkinson), la stratégie adoptée dans ce projet s'inscrit dans le domaine des nanotechnologies. La première étape consiste à évaluer la solubilité du **GNL** et du **dATr** dans différents solvants pour déterminer les meilleures nano-formulations possibles.

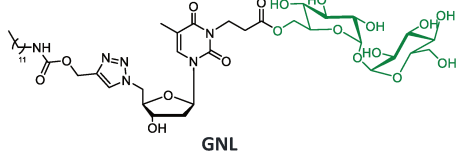



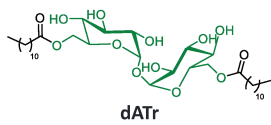



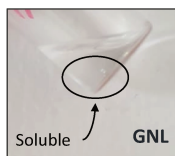
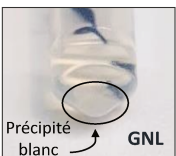
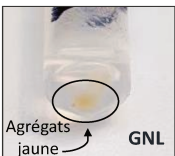
2.1- Test de solubilité des différents composés synthétisés

La solubilité du **GNL** et du **dATr** a été évaluée dans trois milieux différents : un solvant organique (THF), une huile à usage pharmaceutique (Miglyol[®] 812N, approuvée par la FDA et l'EMA) ainsi que dans l'eau, afin de déterminer la formulation la plus adaptée aux molécules d'intérêt parmi trois possibilités envisagées a priori (nanoparticules, nanoémulsions et hydrogels). En effet, un composé soluble dans un solvant organique permettrait l'obtention de nanoparticules (NPs ou SLNs), un composé soluble dans l'huile pourrait quant à lui entrer dans la composition de nanoémulsions simples (H/E) alors qu'un composé plus hydrophile serait plus susceptible de s'auto-assembler en milieu aqueux sous forme de nanofibres qui par interactions entraineraient la stabilisation d'un réseau en trois dimensions donnant ainsi naissance à un hydrogel voire un nanogel.

Pour les deux molécules d'intérêt, deux concentrations ont été testées (2% et 5% m/v) que ce soit à température ambiante ou à 60°C, et l'emploi d'un bain à ultrasons a pu être

nécessaire pour faciliter la solubilisation. Que ce soit dans le cas du Miglyol[®] 812N ou de l'eau déionisée, aucune solubilisation du **GNL** et du **dATr** n'a été observée (**Tableau 5**). Dans le premier cas les molécules ont formé un précipité au fond des tubes qui n'a pas pu être éliminé ni par chauffage ni par le bain à ultrasons. Dans le second cas (eau milli-Q), des agrégats de couleur jaune (couleur liée à la partie lipidique des composés) étaient visibles dans l'échantillon. Partant du postulat que l'addition des chaînes lipidiques a affecté la balance hydrophile-hydrophobe (HLB) du tréhalose (HLB : 21,18) et de ses dérivés (HLB_{GNL} : 20,99 et HLB_{dATr} : 13,27, soit une augmentation du caractère lipophile), nous avons envisagé l'utilisation de mélanges hydro-alcooliques (eau/méthanol, 1 :1). Cependant, aucune modification notable n'a été observée par rapport à l'eau déionisée. À l'inverse, l'emploi de THF pour la solubilisation du **GNL** et du **dATr** s'est avéré fructueux sans nécessiter de chauffage ou de bain à ultrasons.

Tableau 5. Tests de solubilité du GNL et du dATr dans le THF, le Miglyol[®] 812 et l'eau déionisée.

Composés testés (2 et 5 % m/v)	Test dans le THF	Test dans l'huile	Test dans l'eau
 GNL	 Soluble	 Non soluble	 Non soluble
 dATr	 Soluble	 Non soluble	 Non soluble
	 Soluble GNL	 Précipité blanc GNL	 Agrégats jaunes GNL

Les résultats de ces essais montrent bien l'impact des modifications chimiques du tréhalose à la fois sur sa HLB et sa solubilité (tréhalose qui, sous sa forme dihydrate est facilement soluble dans l'eau [224]). Même si la non solubilité des molécules d'intérêt a restreint les options de formulation, celle des nanoparticules restait ouverte. Les résultats évoqués précédemment (**Chapitre V**), ont montré l'intérêt de l'approche nanoparticulaire avec le PLGA dans le cadre du traitement des maladies neurodégénératives grâce à ses propriétés

supplémentaires d'acidification. La combinaison à la fois du PLGA et des dérivés du tréhalose au sein de nanoparticules pourrait donc représenter un réel intérêt dans le cadre d'une approche synergistique.

2.2- Développement de nanovecteurs à base de dérivés du tréhalose

En se basant sur les études précédemment réalisées au sein du laboratoire, les tests de formulation des dérivés du tréhalose se sont dans un premier temps orientés vers la nanoprécipitation [136,225,226]. Ce procédé breveté en 1989 par Fessi *et al.* repose sur le principe de la précipitation d'un composé solubilisé dans un solvant et introduit ensuite dans un non-solvant [227–229]. Le composé est donc solubilisé (le plus souvent dans un solvant organique comme l'éthanol, l'acétone, le THF, ...) avant l'addition goutte à goutte de cette phase dans un non-solvant tel que l'eau. La molécule doit donc être soluble dans le solvant organique mais non soluble dans la phase aqueuse. À noter qu'habituellement la phase organique utilisée est quant à elle miscible avec la phase aqueuse. Après cette addition sous agitation (magnétique ou bain à ultrasons), la phase organique est évaporée soit à température ambiante soit en utilisant un évaporateur rotatif (**Figure 54**). On obtient ainsi une suspension de nanoparticules.

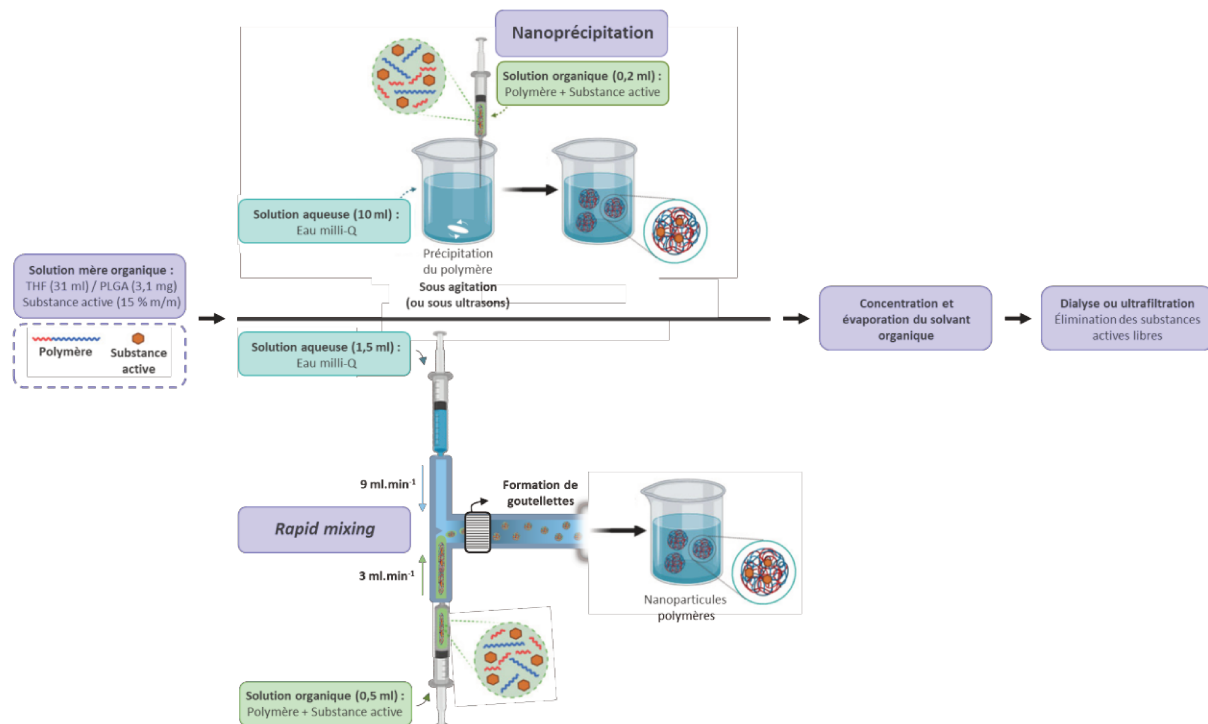


Figure 54. Les deux techniques de formulations utilisées. Représentation schématique en haut de la nanoprécipitation et en bas du rapid mixing, adapté de Zielinska *et al.* [230].

Le procédé de formation des NPs s'effectue en quatre étapes différentes : la super-saturation, la nucléation, la croissance et la coagulation [231]. Lors de l'ajout de la solution de solvant dans le non-solvant, la solubilité de la molécule d'intérêt va être diminuée, entraînant l'apparition de cet état de super-saturation. Celui-ci peut être atteint plus ou moins rapidement en fonction de la vitesse du goutte à goutte, ce qui a un impact sur la taille finale des NPs obtenues : une plus grande super-saturation donnera des particules de diamètre plus faible. Ces fluctuations locales de la concentration en soluté (molécule d'intérêt) entraînent la formation de *nucléi* primaires. Ces derniers vont grossir par l'association avec d'autres molécules d'intérêt jusqu'à atteindre une taille critique pour laquelle les objets obtenus sont stables. Cette stabilité est liée à la sortie de l'état de super-saturation par le système. Les forces d'attraction (Van Der Waals, interaction hydrophobe, ...) et les forces de répulsion (*i.e.* l'encombrement stérique) entrent désormais en jeu. Lorsque les premières sont plus importantes que les secondes, le phénomène de coagulation (adhésion des particules entre elles) peut être observé. Pour limiter ce phénomène et assurer la stabilité du système, il peut être nécessaire d'ajouter à la formulation, soit dans la phase organique soit dans la phase aqueuse, un agent de stabilisation (*i.e.* un tensioactif, le plus souvent dans la phase aqueuse). Comme sous-tendu par le procédé présenté, de nombreux paramètres peuvent avoir un impact crucial sur les propriétés physico-chimiques des nano-objets obtenus, nécessitant leur optimisation pour répondre au cahier des charges. Prenons l'exemple de la vitesse d'ajout de la phase organique : si celle-ci est augmentée, elle favorise la nucléation (atteinte plus rapide de l'état de super-saturation plus rapide) ce qui diminuera fortement le diamètre moyen des particules [232]. Pour pouvoir suivre l'impact des paramètres utilisés lors de la nanopréciipitation sur les objets obtenus, différentes techniques de caractérisation peuvent être utilisées telles que la diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering, DLS, BOX 4*), la charge de surface des NPs (**BOX 4**), ... Ce sont ces dernières qui ont été choisies dans ce projet pour évaluer les potentialités de la nanopréciipitation.

Les premiers essais se sont basés sur le protocole de préparation des NPs acides présenté au chapitre V (**F1**). Une population monodisperse (PdI : $0,144 \pm 0,019$) de nano-vecteurs d'un diamètre moyen de $182,0 \pm 0,8$ nm a été obtenue (**Tableau 6**).

Tableau 6. Caractérisation physico-chimique (taille, Pdl et potentiel zêta) des différentes formulations (NPs et SLNs) en fonction du procédé de formulation.

	Paramètres	F1	F2	F3	F4
Nano précipitation	Diamètre (nm)	182,0 ± 0,8	190,7 ± 1,8	180,4 ± 1,4	/
	Pdl	0,144 ± 0,019	0,135 ± 0,012	0,174 ± 0,015	/
	Potentiel ζ (mV)	-31,7 ± 9,6	-45,4 ± 1,6	-58,1 ± 0,9	/
Rapid mixing	Diamètre (nm)	97,6 ± 17,2	150,5 ± 4,9	167,2 ± 2,4	120,4 ± 1,4
	Pdl	0,147 ± 0,003	0,246 ± 0,038	0,202 ± 0,008	0,228 ± 0,012
	Potentiel ζ (mV)	-47,3 ± 2,0	-41,3 ± 7,5	-35,1 ± 0,6	-16,2 ± 1,7

Cependant, des agrégats de PLGA pouvaient être observés sur les parois du ballon. Des modifications des paramètres de la nanoprécipitation ont alors été envisagées. En utilisant les mêmes phases (organique : THF et PLGA, aqueuse : eau déionisée), l'impact de l'agitation (magnétique plus ou moins forte) et du mode de goutte à goutte (manuel ou au moyen d'un pousse-seringue programmable) a été évalué. Cependant, aucune amélioration notable n'a été observée et nous avons même mis en évidence une augmentation des agrégats de PLGA avec l'agitation magnétique vs. l'agitation par bain à ultrasons. Partant de ses résultats, les conditions initiales de nanoprécipitation des NPs de PLGA ont été conservées. L'objectif étant d'établir la potentialité d'encapsulation des dérivés de tréhalose au sein des NPs de PLGA, ces molécules (solubles dans le THF) ont été dissoutes dans la phase organique. L'addition du **dATr** ou du **GNL** dans la phase organique a conduit par nanoprécipitation à la formation des suspensions de NPs **F2** et **F3** respectivement. Dans les deux cas, une population monodisperse a été obtenue avec des diamètres de particules non statistiquement différents pour **F3** (t-test, $p > 0,05$) et des particules plus grosses dans le cas de **F2**. Les chaînes grasses du **dATr** augmentant la lipophilie du tréhalose ($HLB_{dATr} : 13,27$), les interactions avec le PLGA ont pu être modifiées entraînant cette augmentation de taille. Quelle que soit la formulation (**F1**, **F2** ou **F3**), le potentiel zêta mesuré était toujours supérieur à -30 mV condition assurant une stabilité modérée des nano-objets [233]. L'addition des dérivés du tréhalose n'a donc pas eu d'impact négatif sur ce paramètre physico-chimique.

Malgré les nombreux avantages de la nanoprécipitation (simplicité, stabilité, ...), certains points restent limitants pour envisager des formulations à plus grande échelle : le temps de formulation (20 min de goutte à goutte suivi par 20 min au bain à ultrasons), la concentration en molécule d'intérêt ($4,11 \times 10^{-6}$ mol), ou encore la formation indésirable d'agrégats de PLGA.

C'est pourquoi nous avons choisi d'évaluer le *rapid mixing* (ou gouttelette à flux croisés) en tant qu'approche alternative [234]. Cette technique permet une automatisation de certaines étapes, comme la vitesse d'injection des phases ce qui assure une plus grande maîtrise du procédé. Deux phases (solvant et non-solvant), vont être injectées simultanément à travers des capillaires de faible diamètre (pour ce projet, PEEK bleu de diamètre interne 0,254 mm) jusqu'à une jonction en T. Les vitesses d'injection de la phase organique et de la phase aqueuse peuvent être différentes et modifiées en fonction des objets désirés. Lorsque les 2 phases se rencontrent au niveau de la jonction en T, une émulsion simple se forme et est dirigée avec un angle de 90° dans un troisième capillaire dont le diamètre interne est le double de celui des capillaires précédents (ici PEEK orange de diamètre interne 0,5008 mm). Une évaporation du solvant à température ambiante, par dialyse ou encore par évaporation rotative entraîne la formation des NPs. Comme la forte turbulence générée au sein de ce système entraîne une plus grande diffusion du solvant, on peut observer un indice de polydispersité plus élevé par rapport à la nanoprécipitation ainsi que des tailles de particules plus petites. La taille des particules obtenues dépendra donc de la vitesse d'injection des différentes phases mais également du diamètre interne des capillaires utilisés en amont et en aval de la jonction en T.

Ce procédé a été appliqué à la formulation des NPs de PLGA chargées ou non. Pour se faire, les mêmes solutions mères de THF ont été injectées à une vitesse de 3 ml.min⁻¹ (500 µl) contre de l'eau déionisée à une vitesse de 9 ml.min⁻¹ (1500 µl) pour obtenir un volume final d'émulsion de 2,0 ml. Cette dernière a ensuite été concentrée sous pression réduite (évaporateur rotatif) pour éliminer le THF et obtenir une suspension de NPs. Les mêmes formulations que pour la nanoprécipitation (**F1**, **F2**, **F3**) ainsi que deux autres formulations (**F4** et **F5**) ont été préparé par *rapid mixing* (**Figure 55**).

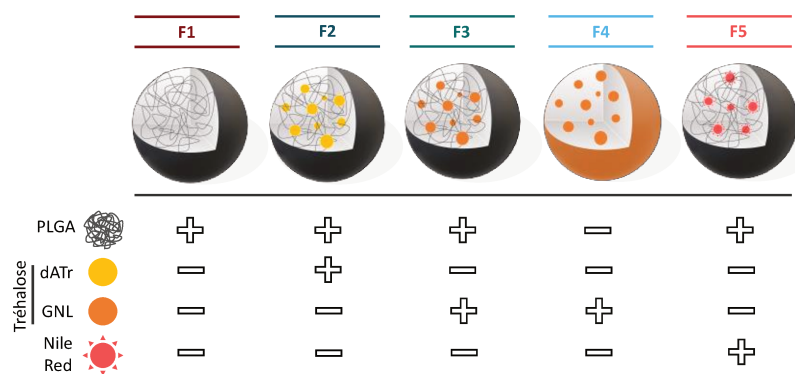


Figure 55. Les différentes formulations obtenues par *rapid mixing*. Les 5 formulations sont des suspensions de : (**F1**) NPs de PLGA vides, (**F2**) NPs de PLGA chargées en dATr, (**F3**) NPs de PLGA chargées en GNL, (**F4**) SNLs uniquement composées de GNL et (**F5**) NPs de PLGA chargées en fluorophore (Nile Red).

La formulation **F4** tire profit de la méthode du *rapid mixing* qui a permis d'obtenir des SLNs grâce aux propriétés d'auto-assemblages du GNL. La phase organique (THF) contenant uniquement du GNL a été injectée dans les mêmes conditions que pour les NPs avec formation de nano-objets uniquement composés de la molécule d'intérêt. Comme attendu, au niveau de la taille et de l'indice de polydispersité, on a observé une diminution significative (t-student, $p < 0,05$) du diamètre des NPs avec une légère augmentation de l'indice de polydispersité (**Tableau 6**). Quant au potentiel zêta il a légèrement varié en raison de la diminution du diamètre des NPs et donc par la modification de la couche hydrodynamique les entourant. Le **GNL** étant une molécule non chargée, la valeur de potentiel zêta observée ($-16,2 \pm 1,7$ mV) est uniquement liée à la double couche électrique entourant les SLNs. Ces valeurs constituent un point de vigilance car elles ne peuvent pas assurer une stabilité colloïdale même modérée (< -30 mV) des nano-vecteurs, avec un fort risque d'agglomération encouru. Malgré cet inconvénient pour **F4**, la durée de formulation trois fois plus faible de la technique de *rapid mixing* par rapport à la nanoprécipitation nous a fait préférer cette méthode pour la suite de ce travail, à savoir la production, la caractérisation et l'évaluation des différentes nanoprécipitations. Enfin, la formulation **F5** correspond à des NPs de PLGA chargées de *Nile Red* pour faciliter l'évaluation biologique de l'internalisation des NPs.

2.3- Caractérisations physico chimiques des nanovecteur

2.3.1- Stabilité colloïdale

La stabilité colloïdale des formulations obtenues par *rapid mixing* a été évaluée à 4°C (condition de stockage) et 37°C (condition d'utilisation) pour s'assurer de l'intégrité des nano-objets au cours des essais *in vitro*. Pour ce faire, le diamètre, l'indice de polydispersité ainsi que le potentiel zêta ont été suivis sur une période de 20 jours (2 fois par semaine) (**Figure 56**).

À 4°C, aucune différence significative (t-test, $p > 0,05$) n'a été observée au bout de 20 jours pour les 3 paramètres suivis. À l'inverse, pour l'étude menée à 37°C, dès 10 jours, une augmentation importante du diamètre et donc de la polydispersité a été observée. Par exemple, dans le cas de **F1** le diamètre moyen des NPs était passé de $142,5 \pm 3,0$ nm à $1909,0 \pm 669,8$ nm avec un PdI de 0,904 mettant en évidence la déstructuration de ce système. Cependant, les analyses biologiques *in vitro* effectuées n'excédant pas 3 jours, l'intégrité des NPs et SLNs demeure assurée pour celle-ci.

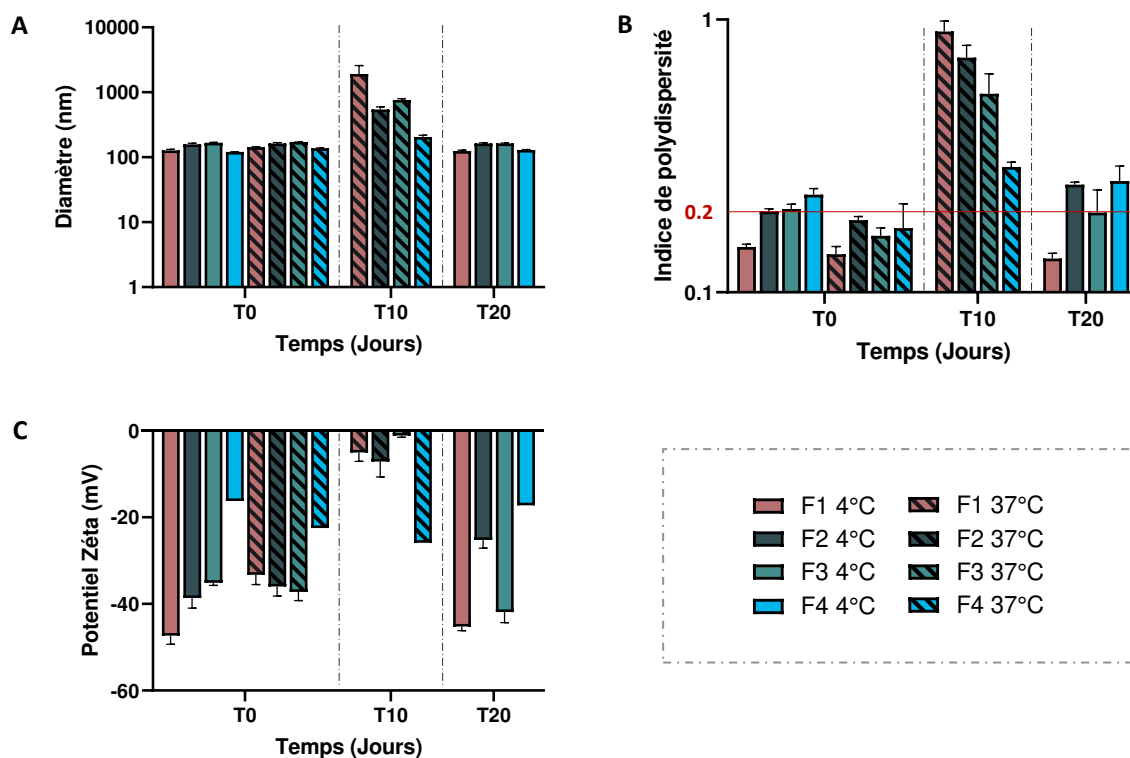
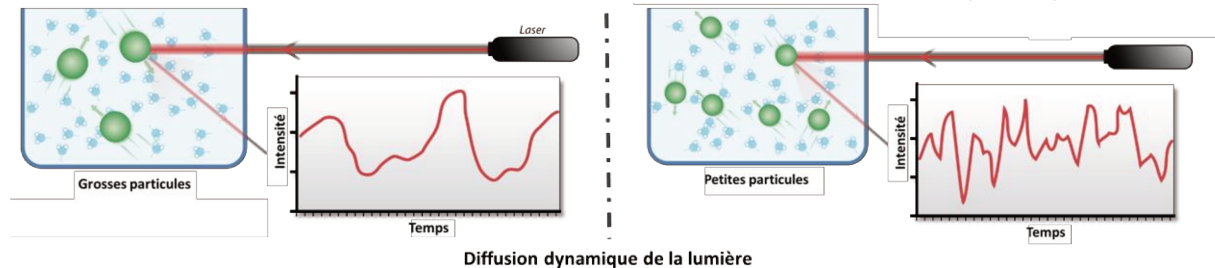


Figure 56. Suivi de la stabilité colloïdale des SLNs et NPs de PLGA chargées ou non en GNLs. Évolution sur 20 jours (A) du diamètre, (B) de l'indice de polydispersité (PDI, suspension monodisperse en dessous de 0,2), et (C) du potentiel ζ de **F1**, **F2**, **F3** et **F4** à 4°C et 37°C.

La stabilité colloïdale ayant été vérifiée pour les durées des analyses *in vitro*, la caractérisation physico-chimique a été poursuivie aux niveaux structural (microscopie électronique) et spectral (spectroscopie IR), afin d'obtenir des informations structurales sur les nano-objets formulés et vérifier la présence de la molécule d'intérêt, le GNL, au sein des NPs.

BOX 4: Principe des analyses par *Dynamic Light Scattering* (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (ou *dynamic light scattering*, DLS) est une technique non invasive d'analyse spectroscopique permettant de déterminer la taille de particules en suspension dans un liquide par suivi de son mouvement brownien. Les mesures par DLS sont basées sur la diffusion (principalement la diffusion de Rayleigh) de la lumière d'un laser après avoir atteint les particules. En effet, lorsqu'un faisceau lumineux rencontre une solution contenant des particules, la lumière se diffuse dans toutes les directions en fonction de la taille et de la forme de ces objets (**Figure**).



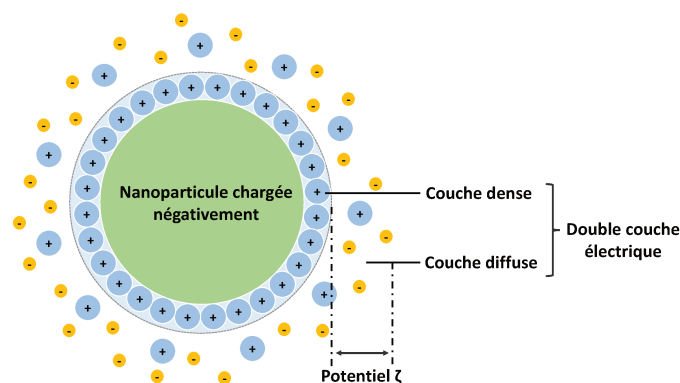
Principe de la DLS.

L'intensité diffusée par des grosses particules (moins mobiles) varie moins vite au cours du temps que pour des petites particules, adapté de Mike Jones.

L'analyse de la fluctuation (d'intensité) de la lumière diffusée permet ainsi d'obtenir la vitesse du mouvement brownien et le coefficient de diffusion (D). Ce dernier est lié au diamètre \varnothing des particules par l'intermédiaire de l'équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta\varnothing}$$

Où D est le coefficient de diffusion ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), k la constante de Boltzmann (J.K^{-1}), T la température absolue (K), η la viscosité de la phase continue (Pa.s) et \varnothing le diamètre hydrodynamique (m). Cette équation permet donc l'obtention du rayon et du diamètre hydrodynamique lui-même associé à l'indice de polydispersité, qui est une indication approximative de la largeur de la distribution. Il est également possible de mesurer, grâce à l'électrophorèse laser Doppler (*electrophoretic light scattering*-ELS), la différence de potentiel à la surface des particules appelé potentiel ζ .



Représentation schématique de la couche électronique entourant une nanoparticule dans l'eau.

Dans le cas de cette étude, les formulations ont été analysées sur le Zetasizer Nano ZS (Malvern instruments), présentant un laser rouge (628 nm) capable d'analyser des nano-objets dans une gamme allant théoriquement de 0,6 nm à 6 μm [235].

2.3.2- Microscopie électronique par transmission (MET)

Pour conforter les résultats obtenus par DLS, nous avons utilisé la microscopie électronique par transmission (MET). En effet elle permet, par rapport à la microscopie optique, d'atteindre une résolution nanométrique grâce à l'utilisation d'un faisceau d'électrons. Ainsi, la taille et la morphologie / structure des nano-objets peuvent être étudiées. Si les observations peuvent être réalisées sans coloration, dans le cas d'échantillons constitués d'atomes légers (tels que C, H, O et N) elle permet d'améliorer la qualité des analyses structurales. Historiquement, l'acétate d'uranyle était l'agent de coloration privilégié par les microscopistes dans le cas de l'analyse de matériels biologiques. Cependant, la nature radioactive de cet agent a récemment fait émerger des alternatives telles que l'Uranyless [236] (mélange de lanthanides) ou le nanotungstène utilisés au cours de cette étude. Enfin, il faut garder à l'esprit que l'échantillon doit être déposé sur une grille puis séché avant introduction dans la colonne sous vide du microscope. Cela veut donc dire que l'échantillon n'est pas observé dans son état natif et que cette étape de séchage peut avoir un impact sur la morphologie des objets analysés (forme, diamètre, ...).

Les différentes formulations obtenues par *rapid mixing* ont été préparées et colorées avant leur observation en MET (**Figure 57**).

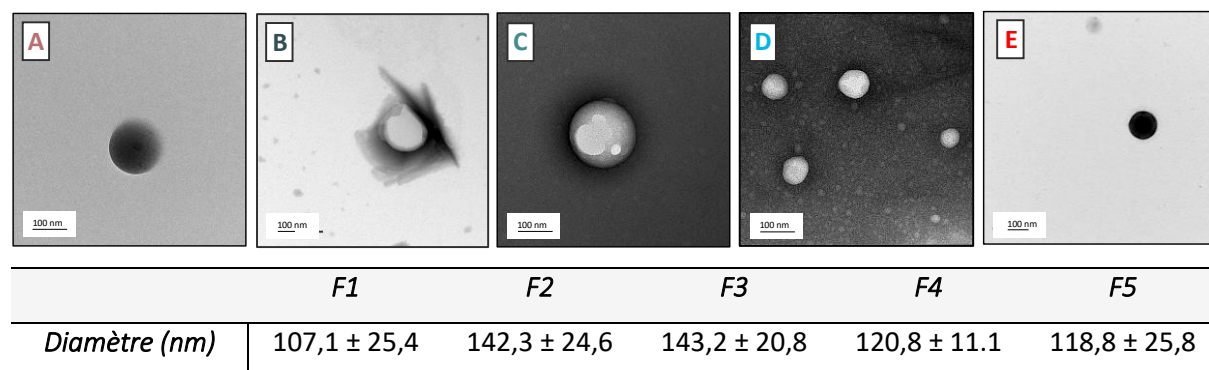


Figure 57. Images de TEM des différentes formulations et valeurs moyennes de leurs diamètres. Images de (A) F1, (B) F2, (C) F3, (D) F4, (E) F5. La caractérisation structurale par TEM a été réalisée en utilisant un Hitachi H7650 (Tokyo, Japon)

On constate que pour tous les échantillons analysés, on obtient des structures sphériques confirmant l'obtention de NPs et de SLNs. Les diamètres mesurés pour les 4 premiers échantillons (**F1 à F4**) ne sont pas statistiquement différents de ceux obtenus en DLS (p-value > 0,05) confirmant la présence de nano-objets de l'ordre de 100-150 nm. L'avantage de la MET s'est illustré de façon flagrante dans le cas de **F5**. En effet, cette formulation contenant du *Nile Red* a empêché son étude par DLS, comme évoqué précédemment, du fait de la couleur de ce

chromophore qui est la même que celle du laser utilisé. La microscopie électronique en s'affranchissant de cet inconvénient a permis l'observation d'objets sphériques d'un diamètre moyen de $118,8 \pm 25,8$ nm cohérent avec les résultats obtenus pour les autres NPs de PLGA (**Figure 57**).

La microscopie électronique permet de pousser plus loin l'exploration jusqu'à la cartographie chimique. Celle-ci est obtenue par microscopie électronique en transmission à balayage (METB ou STEM : *scanning transmission electron microscopy*) couplée à une microanalyse par énergie dispersive de rayons X (EDX, *Energy-Dispersive X-ray*). La METB est une technique qui fait appel à la fois aux principes de la microscopie électronique à balayage et de la MET et pouvant être effectuée sur l'un ou l'autre des appareils. Comme dans le cas de la MET, l'échantillon d'une très fine épaisseur est traversé par un faisceau d'électrons. Ce dernier est focalisé par un jeu de lentilles magnétiques avant de traverser l'échantillon et le balayer. Comparativement à la MET classique, où ne sont analysés que les électrons transmis, en METB d'autres signaux peuvent également être étudiés comme les électrons secondaires, le faisceau d'électrons diffusés ou encore les rayons X. Ces derniers sont émis suite à l'interaction entre le faisceau d'électrons et l'échantillon et leur énergie est caractéristique de la composition élémentaire de l'échantillon. L'EDX de par sa sensibilité à une grande gamme d'éléments, permet donc la détection très fine de la composition chimique d'un échantillon ainsi que la cartographie des structures d'intérêt [237].

Dans le cadre de ce projet, des études exploratoires ont été menées par cette technique (METB-EDX) pour évaluer son potentiel dans la mise en évidence de la présence du **GNL** au sein des NPs de PLGA. En effet, contrairement au PLGA, la molécule d'intérêt possède dans sa structure des atomes d'azote (noyau triazole et thymidine) qui pourraient permettre son identification dans les NPs. Cependant, l'abondance et la réponse de l'azote par EDX étant faible comparativement aux autres atomes (carbone, oxygène, notamment), les essais préliminaires ont été réalisés sur les SLNs, nano-objets uniquement constitués de **GNL**. Dans un premier temps, un échantillon de **F4** coloré au nano-tungstène a été étudié (**Figure 58B**). Nous avons malheureusement constaté que l'observation d'objets par METB est dégradée par un bruit de fond important dû au nano-tungstène, de sorte que le suivi du carbone, de l'oxygène et de l'azote n'a pas été concluant, donnant l'impression d'images en négatif avec uniquement l'empreinte des SLNs (**Figure 58B**).

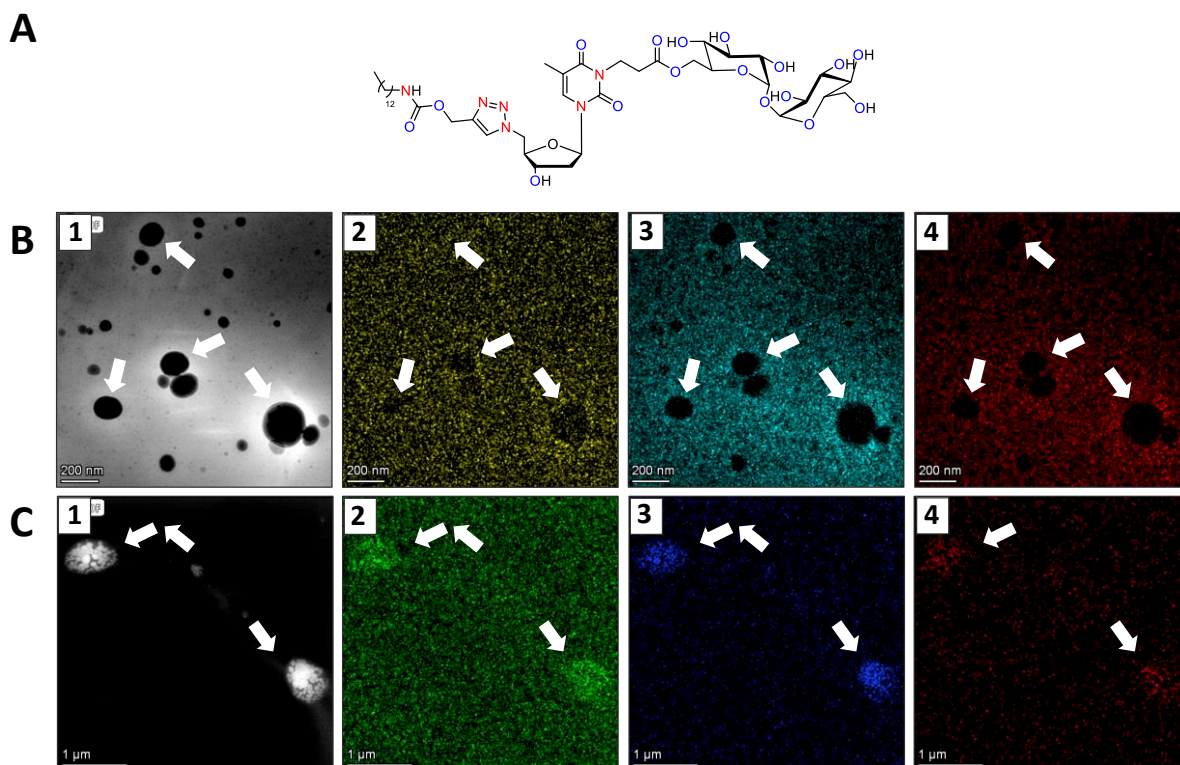


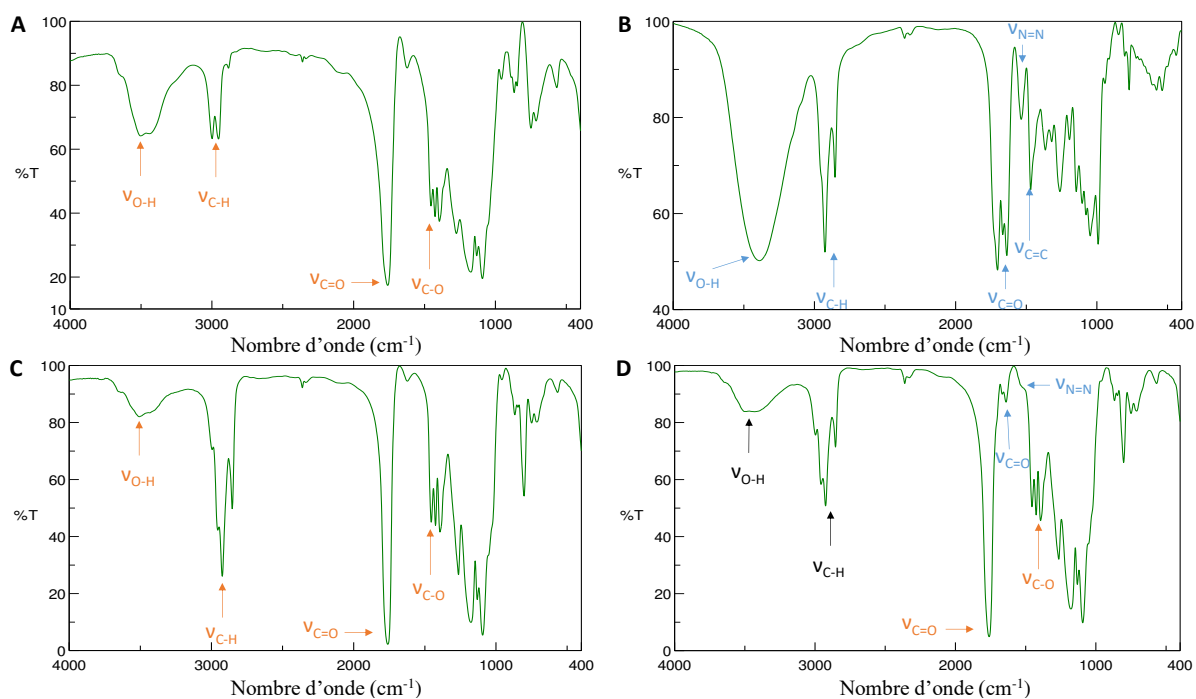
Figure 58. Étude par cartographie chimique (METB) de F4. (A) Structure du GNL. (B) Images de cartographie chimique en METB avec l'utilisation de contrastant (nanotungstène ; barre d'échelle : 200 nm) et (C) sans contrastant (barre d'échelle : 1 μm). Les canaux B2 et C2 permettent l'observation du carbone, B3 et C3 l'observation de l'oxygène, et B4 et C4 l'observation de l'azote.

Une seconde tentative a été effectuée sur des SLNs mais sans nano-tungstène, ce qui a permis cette fois de distinguer clairement des agrégats de SLNs ainsi que les atomes recherchés du GNL (en particulier l'azote) (**Figure 58**). Ces résultats encourageants ont montré l'intérêt de cette approche pour la détection de la molécule d'intérêt, le GNL, au sein des NPs.

2.3.3- Analyses infrarouges

La mise en évidence de la présence du GNL au sein des NPs peut également être envisagée par spectroscopie InfraRouge. Cette technique analytique permet d'identifier les vibrations d'élongation et de valence des liaisons covalentes présentes au sein de la molécule, dont le spectre IR constitue en quelque sorte la carte d'identité.

Nous avons dans un premier temps enregistré les spectres IR du PLGA, du GNL et des NPs de PLGA individuellement pour mettre en évidence les signaux caractéristiques (de vibration et d'élongation (ν)) de chaque composé (**Figure 59**).



Nombre d'onde (cm ⁻¹)	PLGA	GNL	F1	F3
O-H	3504,02	3388,32	3507,88	3507,88
C-H	2998,77 - 2883,06	2925,48 / 2854,13	2994,91 - 2854,13	2996,84 - 2854,13
C=O	1760,69	1702,84 / 1666,2 / 1637,27	1760,69	1760,69 / 1666,2 / 1639,2
N=N	N.A.	1536,99	N.A.	1535,06 (shoulder)
C=C	N.A.	1469,49	N.A.	N.A.
C-O	1454,06 / 1425,14 / 1396,21	1365,35 - 1047,16	1455,99 / 1425,14 / 1394,28	1454,06 / 1425,14 / 1394,28

Figure 59. Analyses infrarouges et tableau résumé des bandes de vibration caractéristiques du PLGA et du GNL également présentes pour F1 et F3. Spectres IR de (A) PLGA, (B) GNL, (C) F1 et (D) F3, acquis par transmission. Les bandes de vibration des liaisons caractéristiques des molécules d'intérêt (PLGA et GNL) sont identifiées dans le tableau et sur les différents spectres (orange pour le PLGA, bleu pour le GNL et noir pour les bandes communes aux 2 molécules)

Que ce soit pour le PLGA ou le GNL, les vibrations d'élongation liées aux liaisons O-H, C-H et C=O ont été identifiées. Dans le cas du GNL, deux autres vibrations d'intérêt ont été mises en évidence : celles liées aux liaisons N=N et C=C présentes au niveau du noyau triazole et de la thymidine. Pour ce qui est des NPs de PLGA, les mêmes vibrations d'élongations sont observées mais avec quelques modifications, comme une diminution de l'intensité de la bande ν_{O-H} ou un affinement et une augmentation de l'intensité de la bande $\nu_{C=O}$, liées à l'établissement d'interactions entre les différentes molécules de PLGA pour former les NPs.

Dans un deuxième temps nous avons étudié le spectre IR des NPs de PLGA chargées de **GNL (F3)** qui était d'autant plus complexe que la proportion de la molécule d'intérêt au sein des NPs était relativement faible dans le PLGA (15% w/w en GNL) (**Figure 59**).

Comme attendu, les signaux associés au PLGA (O-H, C-H, C=O et C-O) ont été facilement identifiables. Pour ce qui est des signaux liés au **GNL**, les bandes de vibrations étaient de plus faible intensité et souvent confondues avec celles du PLGA. Seules les bandes de vibrations $\nu_{C=O}$ du GNL ont pu être identifiées sans ambiguïté. Nous avons pu observer un épaulement pour $\nu_{N=N}$ sur le spectre IR de **F3** mais insuffisant pour conclure à la présence du **GNL** dans les NPs. Cet épaulement dû à la convolution de deux bandes de vibrations, rend nécessaire une étape de déconvolution pour identifier la bande de vibration originelle. En effet, dans le cas de l'étude d'un mélange (ici les NPs de PLGA chargées de **GNL**) les signaux des composés purs peuvent se superposer et donner lieu à l'observation d'épaulements. Pour inverser ce phénomène, l'application d'outils mathématiques spécifiques peut être envisagée comme les fonctions dérivées. L'emploi d'une dérivée première permet de transformer les pics en zéro et également d'amplifier les zones de pente maximale, qui sont alors représentés par des points d'inflexion sur la dérivée première, moyennant, l'augmentation du rapport signal / bruit. Pour permettre de réaliser une dérivation avec lissage pour limiter ce rapport signal / bruit, des outils combinés existent : c'est le cas notamment de l'algorithme de Savitzky-Golay. Ce dernier a été appliqué à la fois au spectre du **GNL** et de **F3** mettant en évidence cinq signaux spécifiques du **GNL** (vibrations d'élongation C=O, N=N et C-O) dans les NPs de PLGA chargées, améliorant significativement les premiers résultats obtenus en IR (**Figure 60**).

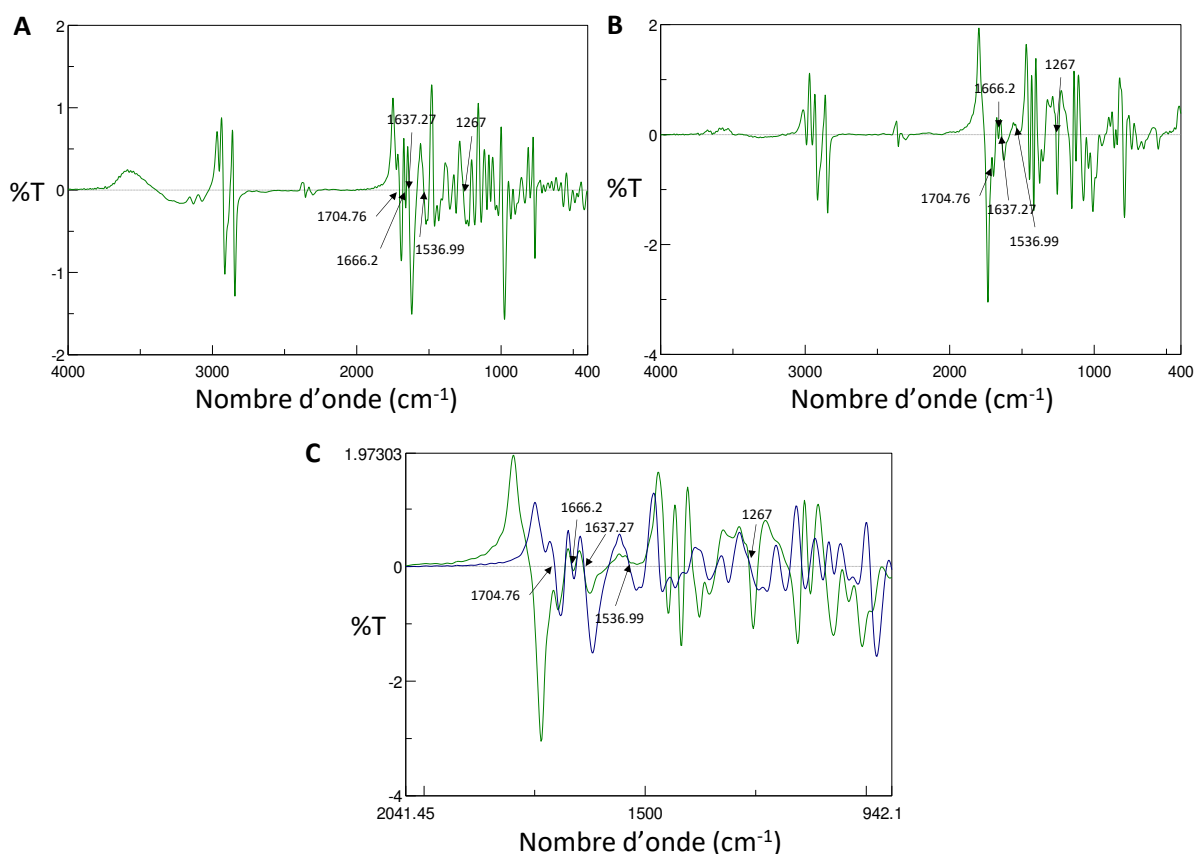


Figure 60. Dérivées premières des spectres infrarouges du GNL et de F3. (A) GNL, (B) F3 et (C) zoom de la superposition des 2 dérivés premières (GNL et F3) (Savitzky-Golay : Ordre de dérivation 1, ordre polynomique 2 et fenêtre de 7 points).

2.4- Efficacité d'encapsulation et taux d'encapsulation

Un aspect primordial dans le développement de nouveaux nano-objets est le développement d'outils analytiques permettant de quantifier la substance active, le tréhalose ou ses dérivés (GNL ou dATr), qu'elle soit encapsulée à l'intérieur des NPs de PLGA, ou restée libre en solution. Dans le second cas, l'option choisie a été la quantification uv-métrique après réaction enzymatique. Le principe de ce dosage repose sur l'action de l'enzyme tréhalase qui a la propriété de cliver le tréhalose en deux unités glucose. Ces glucoses, sous l'action de l'hexokinase cette fois-ci, sont phosphorylés pour donner du glucose-6-phosphate (G-6-P) qui lui-même est oxydé en gluconate-6-phosphate. Cette dernière étape enzymatique est catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase et nécessite l'intervention d'un co-facteur, la forme oxydée du nicotinamine adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺). Ce co-facteur est alors réduit pour donner du NADPH qui est détecté à 340 nm [238]. Cette technique de dosage

indirecte du tréhalose fournit, pour une molécule de tréhalose, deux molécules de NADPH détectées au spectromètre UV (**Figure 61**).

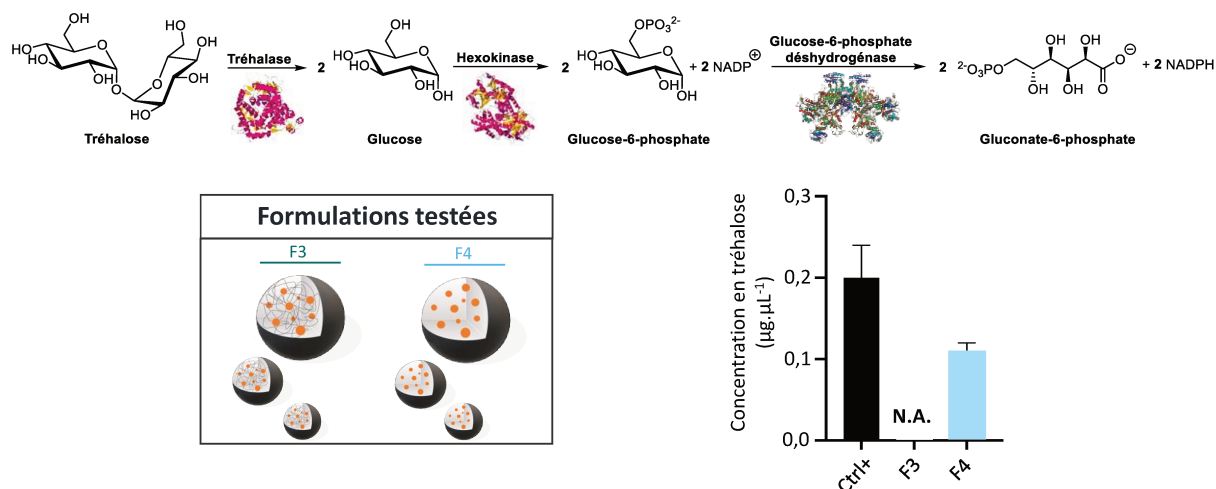


Figure 61. Principe du dosage enzymatique du tréhalose. Dégradation enzymatique du tréhalose permettant la quantification par UV-métrie du **GNL** non encapsulés.

Nous avons pu quantifier de la sorte le **GNL** qui n'était potentiellement pas encapsulé dans les NPs de PLGA ou dans les SLNs, et par la même confirmer les résultats obtenus précédemment par microscopie électronique ou IR, c'est-à-dire la présence du **GNL** à l'intérieur des nano-objets. Pour cela, 3 formulations différentes ont été testées à la même concentration de $0,2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: le tréhalose comme contrôle positif, **F3** pour une première évaluation de l'encapsulation du **GNL** et **F4** pour voir l'impact de l'auto-assemblage du **GNL** sur la protection du tréhalose (**Figure 61**). Dans le cas des NPs de PLGA chargées en **GNL** (**F3**), le tréhalose a pu être détecté mais non quantifié car les absorbances mesurées étaient hors de la gamme d'étalonnage établie ce qui confirme l'encapsulation du **GNL** au sein des NPs de PLGA sans présence en surface du tréhalose. À l'inverse, plus de la moitié de la concentration en tréhalose utilisée pour la formulation des SLNs ($0,110 \pm 0,004 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) a été détectée pour **F4**. Ce résultat prouve l'effet bénéfique de cet auto-assemblage, par rapport à la solution de tréhalose, puisqu'elle permet de protéger une partie non négligeable de la substance active contre une potentielle dégradation enzymatique.

Un autre aspect analytique primordial pour cette étude est la mise en place d'une méthode de quantification du **GNL** permettant de déterminer à la fois l'efficacité de l'encapsulation (EE) et le taux d'encapsulation (*drug loading*, DL) dans le cas des NPs obtenues par *rapid mixing*.

En conservant la technique de quantification par spectroscopie UV, la première étape a été de déterminer la longueur d'onde optimale (λ_{max}) d'analyse. Les spectres UV (200 nm – 400

nm) des différents composés, PLGA, **GNL**, **F1** et **F3**, ont été acquis en solution méthanolique basique (solution de soude à 0,1M), pour permettre à la fois la solubilisation des molécules d'intérêt et la déstabilisation des NPs de PLGA [239] (**Figure 62**).

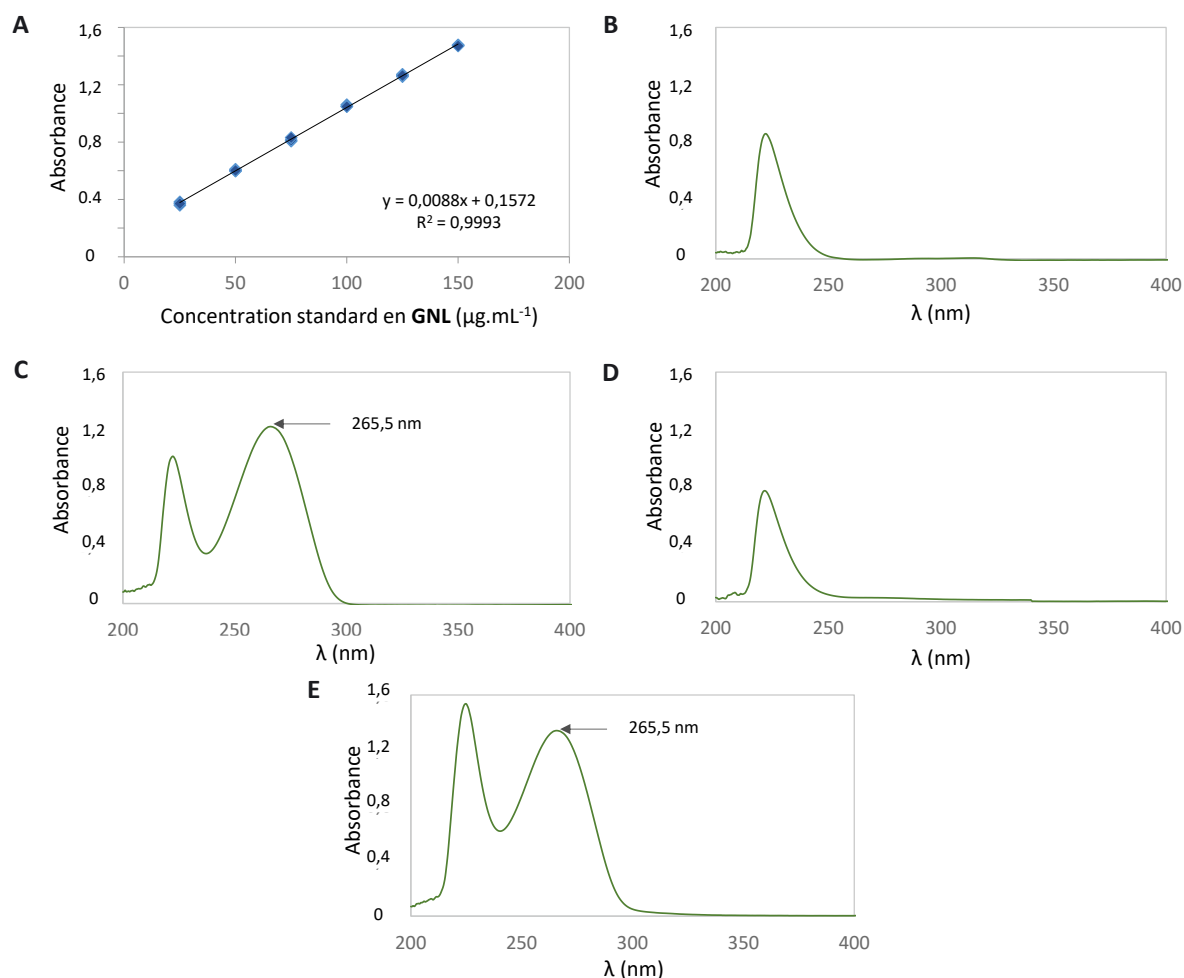


Figure 62. Analyses par spectroscopie UV-Visible des matières premières et NPs. *Courbe d'étalonnage du GNL dans le méthanol (A). Spectres UV du (B) PLGA, (C) GNL, (D) F1 et (E) F3, acquis par spectroscopie UV.*

Le PLGA présente un maximum d'absorbance à 222 nm qui se retrouve sur les spectres de **F1** et **F3**. Le spectre du **GNL** est quant à lui caractérisé par 2 bandes d'absorption à 222 nm et 266,5 nm. Le tréhalose faisant partie de la famille des oses, il ne possède pas de bande d'absorption spécifique dans la zone spectrale étudiée. La bande observable à 266,5 nm est donc due aux doubles liaisons présentes à la fois au niveau du groupement triazole et de la thymidine du **GNL**. Cette bande est également présente sur le spectre de **F3** sans superposition avec un signal provenant du PLGA. La longueur d'onde de 266,5 nm a donc été conservée pour l'établissement de la gamme d'étalonnage et la détermination de EE et DL.

La courbe d'étalonnage du **GNL** a été établie entre 5 et 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Elle est caractérisée par l'équation suivante : $y = 0,0088x + 0,1572$ (1) (où y est la valeur de l'absorbance mesurée à 266,5 nm, et x est la concentration de **GNL** en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) et présente un coefficient de corrélation r^2 de 0,9993. Cette courbe a ensuite été utilisée pour déterminer le taux d'encapsulation du **GNL** à l'intérieur des NPs de PLGA, ainsi que l'efficacité d'encapsulation selon les relations suivantes :

$$\text{DL} = \frac{\text{Quantité de GNL encapsulé}}{\text{Quantité de NPs chargées en GNL}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{EE} = \frac{\text{Quantité de GNL encapsulé}}{\text{Quantité de GNL utilisé pour la formulation des NPs}} \times 100 \quad (3)$$

Nous avons pu ainsi évaluer l'EE des NPs de PLGA chargées en **GNL** à 96% et le DL à 15%. Ces résultats sont en accord avec les valeurs retrouvées dans la littérature [31], et valide du même coup la pertinence du *rapid mixing* comme méthode de formulation des NPs de PLGA pour cette étude.

2.5- Conclusion et perspectives

L'approche nanoparticulaire (PLGA) combine à la fois une protection du **GNL** contre sa dégradation enzymatique au site d'action et un effet synergique potentiel avec le PLGA déjà intrinsèquement intéressant dans le traitement de la maladie de Parkinson [136]. L'utilisation des NPs de PLGA chargées en **GNL** serait à ce titre plus intéressante que celle des SLNs. Les formulations obtenues par *rapid mixing* sont stables colloïdalement durant 10 jours à 37°C et 20 jours *a minima* à 4°C permettant d'envisager des applications *in vitro*. De plus, la période de confinement de mars 2020, a involontairement permis d'obtenir des résultats préliminaires intéressants sur la stabilité à long terme des NPs de PLGA chargées en **GNL**, puisque des échantillons de **F3** conservés à 4°C et contrôlés par DLS ont montré une stabilité dans la taille des objets après 60 jours. La caractérisation par microscopie électronique a permis de confirmer l'aspect sphérique et le diamètre des nano-vecteurs formulés. Cette approche a également permis d'évaluer la potentialité de la METB-EDX pour l'identification du **GNL** dans des objets. De futures études complémentaires seront réalisées pour optimiser les conditions de préparation d'échantillons (contraste spécifique) afin de faciliter l'identification du **GNL** au cœur des NPs même à faible concentration. La spectroscopie IR a confirmé l'encapsulation du **GNL** dans les NPs de PLGA par l'identification, grâce à la dérivée première, des signaux caractéristiques de la molécule d'intérêt.

Les outils analytiques développés ont permis la détermination du DL et EE des NPs de PLGA chargées en GNL confirmant le fait que la technique par *rapid mixing* était optimale pour la préparation de ces objets. L'étape suivante sera l'utilisation de la spectroscopie UV pour cette fois-ci permettre l'étude des cinétiques de libération de la molécule d'intérêt (GNL) en fonction du pH du milieu ou de la présence ou non de tréhalase notamment. Cette étude sera cruciale pour les prochaines étapes de ce projet dans l'optique d'optimiser cet outil pour les évaluations *in vitro* et *in vivo*.

3- Évaluation biologique

3.1- Étude de la toxicité des formulations

La cytotoxicité respective de **F1**, **F2**, **F3** et **F4** a été évaluée *in vitro* (dilution 1/1000) sur des lignées cellulaires de neuroblastome humain (cellules BE(2)-M17) après incubation pendant 24 h par rapport à des cellules non traitées (UT). Le principe de ces tests est de déterminer la viabilité cellulaire en fonction de la capacité des cellules à réduire un colorant tétrazolium (MTS) par l'action d'une enzyme, l'oxydoréductase cellulaire NAD(P)H-dépendante, présente dans les cellules viables. Le tétrazolium est réduit en formazan (produit coloré) qui peut être quantifié en mesurant l'absorbance à 485 nm. Globalement, après 24 h d'exposition, aucune toxicité significative n'a été observée (**Figure 63A**). Pour confirmer ces résultats, d'autres essais MTS (viabilité cellulaire) ont été réalisés à une concentration plus élevée de suspensions de NPs (dilution 1/250) et, de la même manière, leur biocompatibilité a été confirmé (**Figure 63B**).

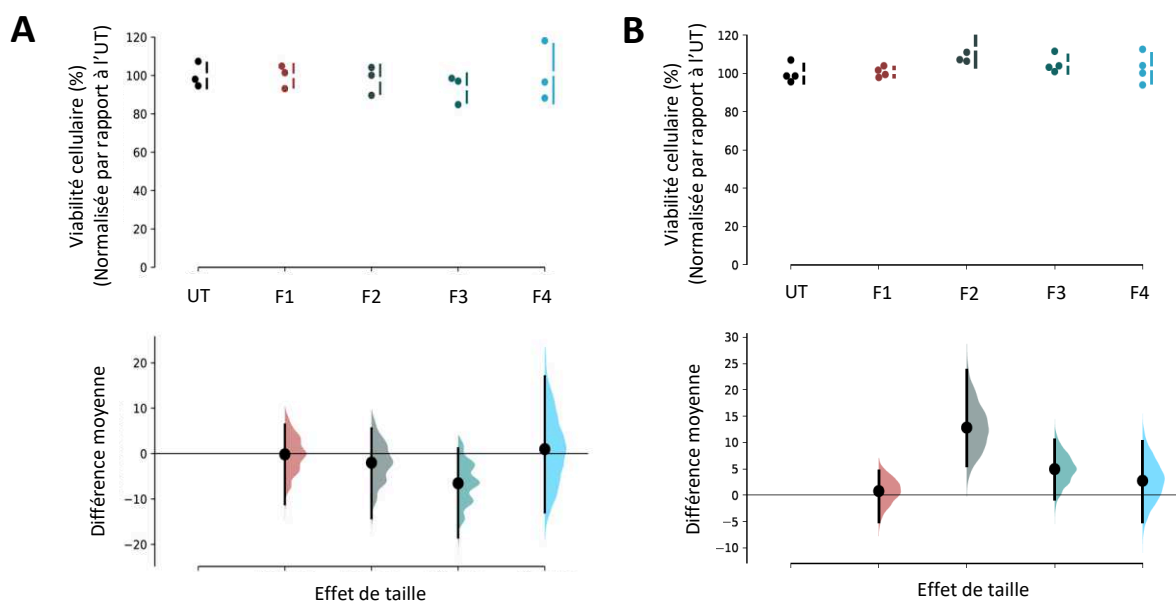


Figure 63. Viabilité cellulaire des SLNs et des NPs chargées ou non. *Évolution de la viabilité cellulaire sur 24h. Cellules BE (2)-M17 traitées avec F1, F2, F3 et F4 par rapport à la condition de contrôle (UT) après 24 h à (A) 1/1000 et (B) 1/250. En bas de ces graphiques, un graphique de la différence de moyenne des groupes F1, F2, F3 et F4 par rapport au groupe contrôle (UT). Aligné horizontalement avec la moyenne du groupe contrôle (illustrée par la ligne verticale noire) est affiché la moyenne de chaque groupe (indiquée par un cercle noir). Les courbes de couleurs indiquent la distribution ou l'effet de taille, par rapport aux données obtenues. L'intervalle de confiance (IC) de la moyenne est de 95 %.*

3.2- Internalisation des NPs à l'intérieur de neurones

Comme mentionné précédemment, la maladie de Parkinson est intimement liée à l'atteinte lysosomale, qui sont des organites acides intracellulaires impliqués dans la dégradation des composants intracellulaires, tels que les polymères biologiques, les protéines, les acides nucléiques, les glucides et les lipides, par le biais de plusieurs voies de dégradation (endocytose, phagocytose et autophagie). Il a été démontré précédemment que les cellules BE(2)-M17 sont des lignées cellulaires neuronales appropriées qui internalisent les NPs dans les lysosomes [136]. Par conséquent, pour confirmer ces résultats et déterminer si ces NPs chargées en GNL peuvent être utilisées comme système de délivrance de substances actives à l'intérieur de cellules neuronales, l'absorption cellulaire des NPs de PLGA a été étudiée (Figure 64).

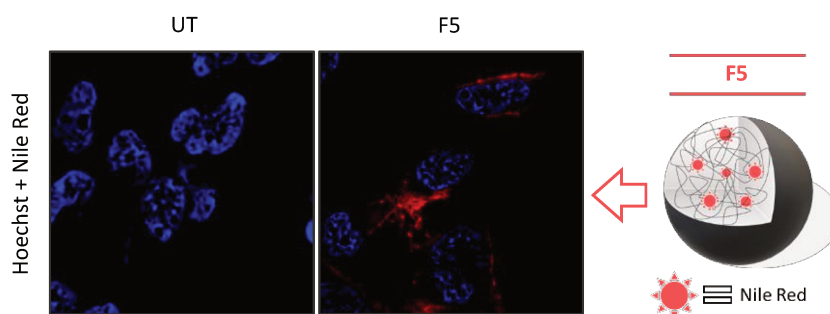


Figure 64. Internalisation des NPs chargées en Nile Red. *Images de microscopie à épifluorescence illustrant l'internalisation de F5 dans les cellules M17 traitées et incubées pendant 24 heures (1/1000). Les noyaux ont été colorés avec du Hoechst (bleu) et F5 est mis en évidence par la présence de Nile Red (rouge). Barre d'échelle : 10µm.*

Comme précédemment décrit dans le Chapitre VI-2, une formulation de NPs de PLGA chargées en fluorophore (F5) a donc été spécialement préparée pour cette étude. Le choix du

fluorophore s'est naturellement orienté sur le Nile Red, un fluorophore présentant un maximum d'émission vers 638 nm (rouge) et déjà décrit comme adapté à l'encapsulation dans les NPs de PLGA [136]. Ainsi, après incubation de cellules BE(2)-M17 traitées avec **F5** pendant 24h, on observe par microscopie (microscope à épifluorescence) que les NPs de **F5** sont bien internalisées à l'intérieur des cellules neuronales humaines.

3.3- Évaluation des propriétés d'induction du flux autophagique des NP chargées en GNLs

Pour contrôler l'induction de l'autophagie par le GNL, des expériences préliminaires ont été effectués associant un test d'immunoblotting pour détecter la protéine associée aux microtubules, la chaîne légère 3 (LC3), une protéine clé dans la voie de l'autophagie (**Figure 65**). Au cours de l'autophagie, la protéine LC3 cytoplasmique est lipidée et recrutée sur les membranes autophagosomales. L'autophagosome se fusionne alors avec le lysosome pour former l'autolysosome, où se produit la décomposition de la vésicule autophagique et son contenu.

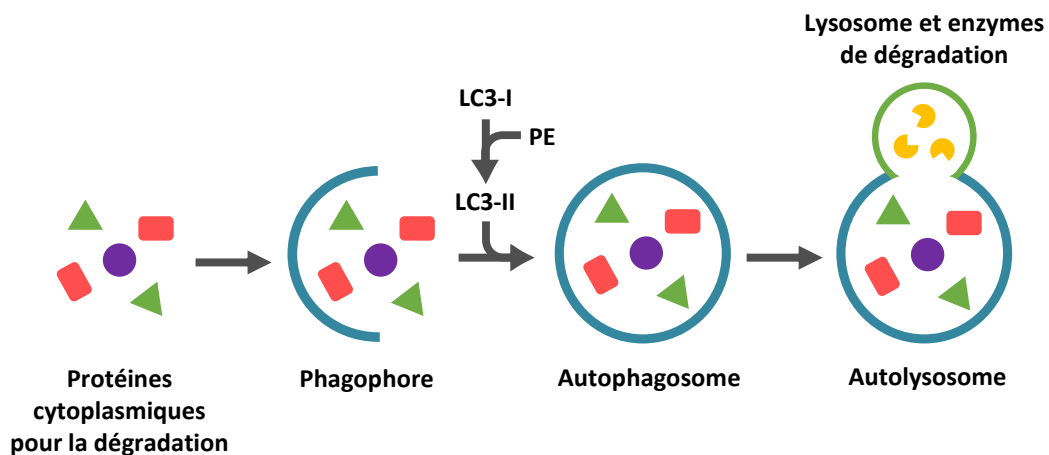


Figure 65. Rôle de la protéine LC3 dans l'autophagie. *Phosphatidyléthanolamine (PE), adapté de [240].*

Les cellules BE(2)-M17 ont été traitées et incubées pendant 24h à 37°C avec les différentes formulations à la dilution 1/1000. Comme l'indiqua l'augmentation des niveaux de LC3B-II par immunoblot (**Figure 66**), l'administration de tréhalose (**dATr**) à l'aide de NPs de PLGA (**F2**) a entraîné une augmentation (1,5 fois plus importante) de l'induction d'autophagie par rapport au contrôle (**Figure 66**). La fonctionnalisation du tréhalose sous forme de GNL (**F3 et F4**) a multiplié quant à elle jusqu'à deux fois l'activité de la substance active. Ces résultats suggèrent que le passage du tréhalose à travers les membranes cellulaires a été grandement

amélioré par l'utilisation de nucléolipides et de nanoformulations, augmentant ainsi la concentration en substances actives au sein des cellules et donc l'induction de l'autophagie. L'amélioration de l'internalisation du tréhalose par son couplage avec un nucléolipide pourrait notamment être due à la ressemblance de ces molécules amphiphiles avec la bicouche lipidique des cellules.

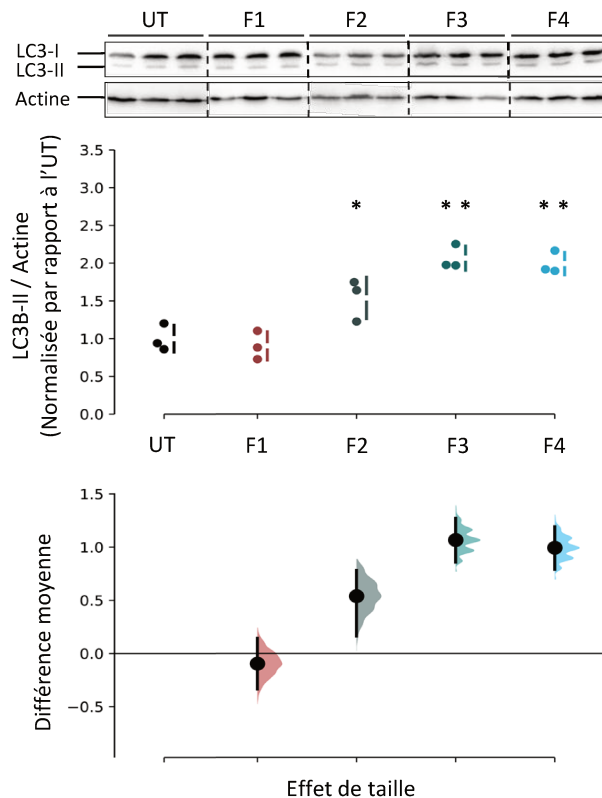


Figure 66. Contrôle des propriétés d'induction de l'autophagie des SLNs et des NPs chargés et non chargés par immunoblotting. En haut images et en bas graphique des tests par immunoblot. Quantification des niveaux de protéine LC3 normalisés par rapport à l'actine dans les cellules BE(2)-M17 traitées avec **F1**, **F2**, **F3** ou **F4** pendant 24 h (1/1 000). $n=3$ par groupe. $*p < 0,05$ par rapport aux cellules non traitées.

Pour valider davantage l'induction de l'autophagie par le **GNL**, les cellules BE(2)-M17 ont été transfectées avec un plasmide portant le rapporteur fluorescent GFP-LC3, avant le traitement avec **F1**, **F2**, **F3** et **F4**. Ce type de plasmide résulte de la fusion d'une protéine fluorescente, la GFP (vert), avec LC3B pour créer une sonde fluorophore sensible au pH qui permet le contrôle de l'activité autophagique *in vitro*. Ce marquage de LC3 permet ainsi de marquer les autophagosomes (AP, non fusionnés aux lysosomes), cependant, la protéine GFP

est sensible au milieu acide et la fusion des autophagosomes avec des lysosomes conduit à la formation d'autolysosomes acides où la fluorescence verte de la GFP y est perdue (**Figure 67**).

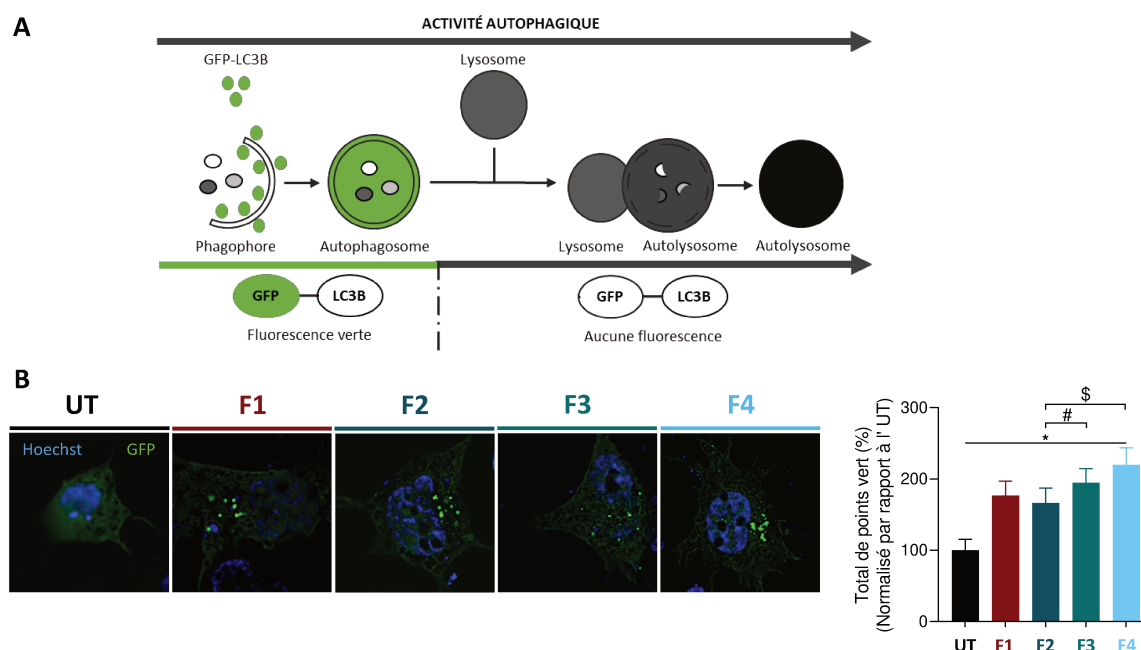


Figure 67. Contrôle des propriétés d'induction du flux autophagique des SLNs et des NPs chargées ou non par l'utilisation d'une sonde fluorescente. (A) Principe d'utilisation du plamide GFP-LC3B, Adapté de Tom Egil Hansen et al. [241]. (B) Quantification des points LC3-positifs par cellule dans les cellules BE(2)-M17 transfectées avec un plamide GFP-LC3 pendant 24 h puis traitées avec F1, F2, F3 ou F4 pendant 24 h (1:1 000). Barre d'échelle : 10µm. * $p < 0,05$ par rapport aux cellules non traitées.

Dans cette expérience, nous avons confirmé une augmentation pouvant s'accompagner d'une accumulation du nombre d'AP (**Figure 67B-C, point vert**) dans les cellules traitées par F2, F3 et F4. Ces premiers résultats suggèrent que le GNL active significativement l'autophagie *in vitro*.

3.4- Conclusion et perspectives

Après formulation du GNL et du dATr à l'intérieur de NPs de PLGA ou sous forme de SLNs, F1, F2, F3, F4 et F5 ont été soumis à une évaluation biologique. Dans un premier temps, des tests de viabilités cellulaires sur des neurones humains ont permis d'attester la biocompatibilité de ce type de nanosystèmes. Dans un second temps, l'utilisation de nanoparticules de PLGA chargées en fluorophore Nile Red, a confirmé la capacité des NPs à traverser les membranes cellulaires. Enfin, les propriétés d'induction du flux autophagique des

nano-vecteurs chargés (ou à base) de **GNL** ont été évaluées par la quantification du taux de protéines LC3 (impliquée dans le processus autophagique). Les essais d'immunoblotting ont montré que de tels formulations pouvaient activer jusqu'à deux fois plus la macroautophagie (**F3** et **F4**) par rapport aux conditions contrôle. Plus intéressant encore, l'induction de l'autophagie lors de la délivrance de tréhalose, sans utilisation d'une partie nucléolipidique (**F2**), est moins importante que dans le cas des **GNL**. L'hypothèse a été émise que le couplage du tréhalose à un nucléolipide améliore significativement son internalisation au sein des neurones, se traduisant par une concentration en tréhalose supérieure à l'intérieur des cellules, et donc un flux autophagique plus important. Ces résultats ont également pu être confirmés *via* l'utilisation d'un plasmide et la visualisation au microscope du nombre d'autophagosomes après incubation avec **F1**, **F2**, **F3** et **F4**. Les résultats de cette étude ont donné lieu à un article soumis dans le *Journal of Materials Chemistry B* (TB-ART-10-2021-002190).

A court terme, il nous reste à effectuer des expériences complémentaires avec un traitement inhibiteur de la pompe à proton, tel que la Bafilomycine A₁, pour caractériser le flux autophagique en réalisant un immunoblot LC3. De plus, nous souhaiterions également utiliser le plasmide mCherry-GFP-LC3B pour suivre d'une manière complémentaire et différente le flux autophagique.

À moyen terme, l'évaluation de l'effet synergique des propriétés acides du PLGA et des propriétés d'activation de l'autophagie du tréhalose sera effectuée. Des essais à différentes concentrations en **GNL** et **dATr** seront également réalisés afin de déterminer si l'induction du flux autophagique est dose-dépendant. Enfin, l'effet des GNLs devra être testé sur des modèles *in vitro* pathologiques de la maladie de Parkinson et dans un contexte d'agrégation de l' α -synucléine avant leur évaluation *in vivo*.

Trehalose-based Nucleolipids as efficient nanocarriers for intracellular delivery and autophagy induction activity

Anthony Cunha ^{1,2}, Alexandra Gaubert ¹, Julien Verget ¹, Marie-Laure Thiolat ², Philippe Barthélémy ¹, Laurent Latxague ^{1*†}, Benjamin Dehay ^{2*#}

¹ Univ. Bordeaux, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, ARNA, ARN: Régulations Naturelle et Artificielle, ChemBioPharm, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux CEDEX, France

² Univ. Bordeaux, CNRS, IMN, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

* Correspondence: benjamin.dehay@u-bordeaux.fr (B.D.)

L. Latxague and B. Dehay are co-last authors

† Deceased December 13, 2021

Abstract: The Autophagy Lysosomal Pathway is one of the most important mechanisms for removing dysfunctional cellular components. Increasing evidence suggests that alterations in this pathway play a pathogenic role in Parkinson's disease, making it a point of particular vulnerability. Numerous studies have proposed nanotechnologies as a promising approach for delivering active substances within the central nervous system to treat and diagnose neurodegenerative diseases. In this context, we designed a trehalose-based nanosystem by combining both a small natural autophagy enhancer molecule named trehalose and an amphiphilic nucleolipid conjugate. To improve nucleolipid protection and cellular uptake, these conjugates were formulated by rapid mixing in either solid lipid nanoparticles ($\text{Ø} = 120.4 \pm 1.4$ nm) or incorporated into poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles ($\text{Ø} = 167.2 \pm 2.4$ nm). *In vitro* biological assays demonstrated a safe and an efficient cellular uptake associated with autophagy induction. Overall, these nucleolipid-based formulations represent a promising new delivery tool to deliver trehalose and restoring the autophagy impaired function.

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.;

Lastname, F. Title. *Pharmaceutics*

2021, 13, x.

<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Keywords: Nucleolipids, Nanoparticles, PLGA, Trehalose, Autophagy

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Due to their prevalence, high societal costs, and the absence of disease-modifying or neuroprotective therapeutic strategies, one of the major challenges today lies in discovering new therapies for neurodegenerative diseases (NDD). Parkinson's disease (PD) is the second most common NDD after Alzheimer's disease [1]. PD is characterized by a selective neuronal vulnerability, including degeneration in specific brain regions hosting dopaminergic neurons and deposits of misfolded α -synuclein-rich protein aggregates [2]. Among the pathological mechanisms involved in the pathogenesis of PD, alteration of the lysosomal function of dopaminergic neurons is of increasing interest in PD research. Lysosomal impairment is now described as a major contributor to the pathogenesis of this disease [3]. Indeed, lysosomes are organelles responsible for the clearance, through autophagy, of long-lived proteins, such as α -synuclein, which tend to aggregate due to its misfolding. In PD, α -synuclein aggregation interferes with cellular homeostasis and impairs cellular degradation systems, leading to neuronal death. Thus, restoring lysosomal function represents one of the attractive pathological targets for developing new therapeutic approaches. Trehalose belongs to the therapeutic arsenal against lysosomal failure. Trehalose is a non-reducing disaccharide widely used in the food industry [4], which has recently shown unique properties, particularly in preventing neurodegeneration. Trehalose can act as a potent protein stabilizer, preserving the structural integrity of proteins

and inducing autophagy to improve the clearance of toxic proteins. Trehalose treatment reduced the level of toxic protein aggregates, thereby improving behavioural symptoms and survival in animal models of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's [5], Parkinson's [6,7], and Huntington's diseases [8]. However, this small molecule is widely distributed upon administration and needs to be specifically delivered to the damaged brain neurons.

One approach to overcome this limitation relies on the use of nanotechnologies [9,10] such as poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles (PLGA NPs) [11,12] or solid lipid nanoparticles (SLNs) based on nucleolipids (NLs) [13,14]. First, PLGA NPs are biocompatible, non-toxic, and offer many advantages, including improved drug solubility, protection against enzymatic digestion, increased targeting efficiency, and better cellular internalization [15]. Previous studies showed that empty PLGA NPs restored lysosome acidification failures, particularly in experimental models of PD [16–18]. Second, NL-based SLNs also represent good candidates [19] due to their bio-inspired nature, biocompatibility, biological activities (antimicrobial properties, antifungal, antiviral, antitumor, ...), and their remarkable self-assembly capacity [20,21]. Indeed, these amphiphilic molecules can form supramolecular objects such as SLNs, micelles, or liposomes, which can be used to carry active substances, such as DNA, antisense oligonucleotides or siRNA directly into cells [22]. Moreover, thanks to molecular recognition, nucleosides can pass cellular membranes through specific transporters while their lipidization allows their absorption by passive diffusion [23,24]. In addition, we have recently demonstrated that the latter was a good strategy to facilitate the passage of the BBB, as in the case of uridine with a lipidic diketal (C15), used as a neurotracer, which successfully crossed the BBB [25].

Despite the many advantages of nanotechnology for the delivery of active substances, only few studies have focused on the delivery of trehalose using nanovectors for the treatment of neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease [26–28].

In this study we report the synthesis of trehalose-NLs (hereafter called GNLs for glyco-nucleolipids) embedded in PLGA NPs and SLNs as original nanosystems. We demonstrated *in-vitro* that the combination of trehalose and NL did not induce any cellular toxicity, while improving the uptake and internalization of GNLs into neuronal cells associated with the trehalose-induced autophagy effect. The encouraging results described herein suggest that GNL-based nanovectors may be efficient nanocarriers for trehalose delivery.

2. Materials and Methods

2.1. Procedure for glyconucleolipids synthesis

All reactions were carried out under an argon atmosphere. Yields refer to chromatographically and spectroscopically ($^1\text{H-NMR}$) homogeneous materials, unless otherwise stated. All reagent-grade chemicals were obtained from commercial suppliers and were used as received, unless otherwise stated. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ were recorded on a Bruker Avance 300 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75.46 MHz) spectrometer using residual CHCl_3 as internal reference (7.26 ppm) and at 293K unless otherwise indicated. The chemical shifts (δ) and coupling constants (J) were expressed in ppm and Hz respectively. The following abbreviations were used to explain the multiplicities: s= singlet, d= doublet, t= triplet, q= quartet, m= multiplet, b= broad. FT-IR spectra were acquired on a Perkin-Elmer FT spectrometer Spectrum two (UATR two). For the ESI HRMS analyses, a Waters Micromass ZQ instrument equipped with an electrospray source was used in the positive and/or negative mode. MALDI TOF mass spectrometric analyses were performed on a Perseptive Biosystems Voyager-De Pro MALDI mass spectrometer in the Linear mode using 3,4-dihydroxybenzoic acid as the matrix. Analytical thin layer chromatographies were performed using silica gel 60 F254 pre-coated plates (Merck) with visualization by ultraviolet light,

potassium permanganate or sulfuric acid. Flash chromatography were performed on silica gel (0.043-0.063 mm). 96
97

2.2. Synthesis of compound 1: 5'-azido-5'-deoxythymidine 98

To a solution of thymidine (1 equiv., 2 g, 8.26 mmol), in anhydrous DMF (40 mL) and under argon, were sequentially added triphenylphosphine (1.2 equiv., 2.6 g, 9.91 mmol), sodium azide (5 equiv., 2.68 g, 41.3 mmol) and carbon tetrabromide (1.2 equiv., 3.29 g, 9.91 mmol). The mixture was stirred 24 h at room temperature until completion of reaction. The reaction was then quenched by addition of an aq. NaHCO₃ solution (50 mL) and the resulting mixture diluted with water (30 mL). The aqueous phase was extracted three times with dichloromethane (DCM) (3×30 mL), and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before concentration to dryness under vacuum. The resulting crude was purified by flash chromatography on a silica gel (DCM/MeOH, gradient 99:1 to 95:5) to obtain the expected compound **1** as a white powder (1.63 g, 74 %). NMR data were consistent with the literature [29]. **R_f**: 0.37 (DCM/MeOH, 95:5). ¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 1.90 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H, CH₃ thymidine), 2.25-2.33 (m, 2H, H₂), 3.56 (dd, *J* = 3.9 Hz, 13.2 Hz, 1H, H_{5a}'), 3.66 (dd, *J* = 5.1 Hz, 13.5 Hz, 1H, H_{5b}'), 3.96 (q, *J* = 3.9 Hz, 9 Hz, 2H, H₄'), 4.32-4.37 (m, 1H, H₃'), 6.27 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H₁'), 7.54 (s, 1H, H₆). 109
110
111
112

2.3. Synthesis of compound 2: 3-(5'-azido-5'-deoxythymidin-3-yl) methyl propanoate 113

To a solution of **1** (1 equiv., 0.500 g, 1.87 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) and under argon were sequentially added DBU (1.55 equiv., 433 μL, 2.90 mmol) and methyl acrylate (1.55 equiv., 261 μL, 2.90 mmol). The mixture was stirred overnight at 60°C until completion of reaction and followed by concentration to dryness under vacuum. The resulting crude was purified by flash chromatography on a silica gel (DCM/MeOH, gradient 98:2 to 96:4) to obtain the expected compound **2** as a colorless oil (0.436 g, 66 %). **R_f**: 0.43 (DCM/MeOH, 95:5). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.89 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H, CH₃ thymidine), 2.09-2.23 (m, 1H, H_{2a}'), 2.28-2.41 (m, 1H, H_{2b}'), 2.59 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_B linker), 3.55 (dd, *J* = 3.6 Hz, 13.2 Hz, 1H, H_{5a}'), 3.68 (dd, *J* = 3.0 Hz, 12.9 Hz, 1H, H_{5b}'), 3.62 (s, 3H, H_C linker), 4.01 (q, *J* = 3.6 Hz, 1H, H₄'), 4.18 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_A linker), 4.33-4.43 (m, 1H, H₃'), 6.26 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H₁'), 7.34 (s, 1H, H₆). ¹³C NMR (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 13.3 (CH₃ thymidine), 32.1 (CH₂-B linker), 37.2 (CH₂-A linker), 40.2 (C₂'), 51.9 (CH₃-C linker), 52.2 (C₅'), 71.4 (C₃'), 84.5 (C₄'), 85.5 (C₁'), 110.4 (C₅'), 133.9 (C₆'), 150.6 (C=O thymidine), 163.2 (C=O thymidine), 171.9 (C=O linker). 114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127

2.4. Synthesis of compound 3: 3-[3'-O-(tert-butyl dimethylsilyl)-5'-azido-5'-deoxythymidin-3-yl] methyl propanoate 128 129

To a solution of **2** (1 equiv., 0.430 mg, 1.22 mmol) in anhydrous DMF (2.6 mL) and under argon were sequentially added TBDMSCl (1.2 equiv., 0.220 g, 1.46 mmol) and imidazole (1.2 equiv., 0.099 g, 1.46 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature until completion of reaction. DCM was added and the precipitate formed was filtered. The mixture was then diluted with toluene (100 mL), and DMF was co-evaporated under vacuum to obtain a yellow oil. The resulting crude was purified by flash chromatography on a silica gel (petroleum ether/EtOAc, 70:30) to obtain the expected compound **3** as a colorless oil (0.491 g, 86 %). **R_f**: 0.63 (petroleum ether/EtOAc, 70/30). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): -0.05 (s, 6H, CH₃-Si), 0.75 (s, 9H, ^tBu), 1.80 (s, 3H, CH₃ thymidine), 1.97-2.24 (m, 2H, H₂'), 2.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_B linker), 3.38 (dd, *J* = 3.9 Hz, 13.5 Hz, 1H, H_{5a}'), 3.48-3.59 (m, 4H, H_C linker et H_{5b}'), 3.78-3.85 (m, 1H, H₄'), 4.09 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_A linker), 4.19-4.27 (m, 1H, H₃'), 6.13 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H₁'), 7.20 (s, 1H, H₆). ¹³C NMR (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm): -5.17 (CH₃-Si), -4.9 (CH₃-Si), 13.0 (CH₃ thymidine), 17.6 (C_q ^tBu), 25.4 (CH₃ ^tBu), 31.8 (CH₂-B linker), 36.8 (CH₂-A linker), 40.4 (C₂'), 51.4 (CH₃-C linker), 51.5 130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143

(C₅), 71.5 (C₃), 84.6 (C₄), 85.3 (C₁), 110.0 (C₅), 133.4 (C₆), 150.3 (C=O thymidine), 162.7 (C=O thymidine), 171.3 (C=O linker). 144
145

2.5. Synthesis of compound 4: Propargyl N-dodecylcarbamate 146

To a solution of dodecylamine (1 equiv., 0.400 g, 2.16 mmol) in anhydrous DCM (6 mL) and under argon were sequentially added triethylamine (1.05 equiv., 0.229 g, 2.27 mmol) and drop by drop propargyl chloroformate (1 equiv., 0.256 g, 2.16 mmol). The mixture was stirred 3 h at 0°C until completion of reaction followed by concentration to dryness under vacuum. The resulting crude was purified by flash chromatography on a silica gel (petroleum ether/EtOAc, 90:10) to obtain the expected compound 4 as a colorless oil (0.333 g, 97%). **R_f**: 0.61 (petroleum ether/EtOAc, 90:10). **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.72-0.85 (m, 3H, CH₃ lipid), 1.19 (s, 18H, CH₂ lipid), 1.37-1.52 (m, 2H, CH₂-CH₃ lipid), 2.40 (s, 1H, CH propargyl), 3.03-3.17 (m, 2H, CH₂-NH lipid), 4.60 (s, 2H, CH₂ propargyl), 4.99-5.24 (bs, 1H, NH lipid). **¹³C NMR** (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14.1 (CH₃ lipid), 22.7 (CH₂ lipid), 26.7 (CH₂ lipid), 29.3 (CH₂ lipid), 29.3 (CH₂ lipid), 29.5 (CH₂ lipid), 29.6 (CH₂ lipid), 29.6 (CH₂ lipid), 29.6 (CH₂ lipid), 29.8 (CH₂-CH₃ lipid), 31.9 (CH₂ lipid), 41.2 (CH₂-NH lipid), 52.2 (CH₂ propargyl), 74.4 (CH propargyl), 78.4 (C propargyl), 155.5 (C=O lipid). 151
152
153
154
155
156
157
158
159
160

2.6. Synthesis of compound 5: 3'-[3'-O-(tert-butyl dimethylsilyl)-5'-{4-[(dodecylcarbamoyloxy)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-5'-deoxythymidin-3-yl] methyl propanoate 161 162 163

To a solution of 3 (1 equiv., 0.316 g, 0.68 mmol) in a mixture of H₂O/THF (1:1, 5 mL) were sequentially added 4 (1 equiv., 0.181 g, 0.68 mmol), copper (II) sulfate pentahydrate (0.1 equiv., 0.011 g, 0.07 mmol) and sodium ascorbate (0.2 equiv., 0.027 g, 0.14 mmol). The mixture was stirred overnight at 60°C until completion of reaction followed by concentration to dryness under vacuum to obtain a green product. It was washed several times with EDTA until colorless organic phases were obtained, followed by concentration to dryness under vacuum. The resulting crude was purified by flash chromatography on a silica gel (toluene/acetone, 80:20) to obtain the expected compound 5 as a white powder (0.433 g, 87%). **R_f**: 0.33 (toluene/acetone, 80:20). **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.04-0.07 (m, 6H, CH₃-Si), 0.78-0.92 (m, 12H, CH₃ lipid et ^tBu), 1.20 (m, 18H, CH₂ lipid), 1.33-1.49 (m, 2H, CH₂-CH₃ lipid), 1.84 (s, 3H, CH₃ thymidine), 2.00-2.77 (m, 2H, H₂), 2.58 (t, J = 7.2 Hz, 2H, H_B linker), 3.03-3.14 (m, 2H, CH₂-NH lipid), 3.62 (s, 3H, H_C linker), 4.02-4.11 (m, 1H, H₄), 4.17 (t, J = 7.8 Hz, 2H, H_A linker), 4.34-4.48 (m, 1H, H₃), 4.52-4.63 (m, 2H, H₅), 4.93-5.04 (m, 1H, NH lipid), 5.10 (s, 2H, O-CH₂ triazole), 6.15 (t, J = 6.6 Hz, 1H, H₁), 6.60 (s, 1H, H₆), 7.66 (s, 1H, CH triazole). **¹³C NMR** (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm): -4.8 (CH₃-Si), -4.6 (CH₃-Si), 13.2 (CH₃ thymidine), 14.1 (CH₃ lipid), 17.8 (C_q ^tBu), 22.7 (CH₂ lipid), 25.7 (CH₃ ^tBu), 26.7 (CH₂ lipid), 29.3 (CH₂ lipid), 29.3 (CH₂ lipid), 29.6 (CH₂ lipid), 29.6 (CH₂ lipid), 29.6 (CH₂ lipid), 29.8 (CH₂-CH₃ lipid), 29.9 (CH₂ lipid), 31.9 (CH₂ lipid), 32.1 (CH₂-B linker), 37.1 (CH₂-A linker), 39.5 (C₂), 41.1 (CH₂-NH lipid), 50.5 (C₅), 51.8 (CH₃-C linker), 57.7 (O-CH₂ triazole), 71.7 (C₃), 83.9 (C₄), 86.0 (C₁), 110.8 (C₅), 125.6 (CH triazole), 133.8 (C₆), 143.6 (C triazole), 150.5 (C=O thymidine), 156.2 (C=O lipid), 162.9 (C=O thymidine), 171.6 (C=O linker). **HRMS** (ESI) [M+H⁺]: calcd = 735.44712, found = 735.44576. 164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185

2.7. Synthesis of compound 6: 3'-[3'-O-(tert-butyl dimethylsilyl)-5'-{4-[(dodecylcarbamoyloxy)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-5'-deoxythymidin-3-yl] propanoic acid 186 187

Compound 5 (1 equiv., 0.431 g, 0.59 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (13 mL) before adding a solution of NaOH (1N) in MeOH (1.3 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature until completion of reaction. The reaction mixture was treated with a solution of HCl (5%) to reach neutrality and then concentrated to dryness under vacuum. The resulting crude was purified by flash chromatography on a silica gel 188
189
190
191
192

(DCM/MeOH, 90:10) to obtain the expected compound **6** (0.310 g, 73%). **R_f**: 0.26 (DCM/MeOH, 90:10). **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): -0.05-0.05 (m, 6H, CH₃-Si), 0.73-0.85 (m, 12H, CH₃ lipid et ^tBu), 1.10-1.27 (m, 18H, CH₂ lipid), 1.29-1.47 (m, 2H, CH₂-CH₃ lipid), 1.79 (s, 3H, CH₃ thymidine), 2.07-2.21 (m, 2H, H₂), 2.37-2.51 (m, 2H, H_B linker), 2.89-3.11 (m, 2H, CH₂-NH lipid), 3.97-4.15 (m, 3H, H₄ et H_A linker), 4.30-4.43 (m, 1H, H₃), 4.50-4.59 (m, 2H, H₅), 5.07 (s, 2H, O-CH₂ triazole), 5.21-5.31 (m, 1H, NH lipid), 6.09 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H₁), 6.61 (s, 1H, H₆), 7.67 (s, 1H, CH triazole), 7.75-8.12 (bs, 1H, COOH linker). **¹³C NMR** (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm): -4.9 (CH₃-Si), -4.8 (CH₃-Si), 13.1 (CH₃ thymidine), 14.0 (CH₃ lipid), 17.7 (C_q ^tBu), 22.6 (CH₂ lipid), 25.5 (CH₃ ^tBu), 26.7 (CH₂ lipid), 29.2 (CH₂ lipid), 29.2 (CH₂ lipid), 29.3 (CH₂ lipid), 29.4 (CH₂ lipid), 29.5 (CH₂ lipid), 29.5 (CH₂-CH₃ lipid), 29.8 (CH₂ lipid), 31.8 (CH₂ lipid), 33.6 (CH₂-B linker), 38.0 (CH₂-A linker), 39.2 (C₂), 41.0 (CH₂-NH lipid), 50.6 (C₅), 57.6 (O-CH₂ triazole), 71.8 (C₃), 84.0 (C₄), 86.3 (C₁), 110.5 (C₅), 125.3 (CH triazole), 133.8 (C₆), 143.5 (C triazole), 150.4 (C=O thymidine), 156.1 (C=O lipid), 162.9 (C=O thymidine), 175.9 (C=O linker). **HRMS** (ESI) [M+H⁺]: calcd = 721.43147, found = 721.43198.

2.8. Synthesis of compound 7: 2, 2', 3, 3', 4, 4', 6'-hepta-O-(trimethylsilyl)-α,α'-D-trehalose

D-(+)-trehalose dihydrate (1 equiv., 0.500 g, 1.32 mmol) was co-evaporated to dryness under vacuum with anhydrous DMF (3×10 mL). To a solution of this latter, dissolved in anhydrous DMF (4 mL), were sequentially added N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide (8.6 equiv., 2.78 mL, 11.37 mmol) and TBAF (0.06 equiv., 79 μL, 0.08 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature until completion of reaction. The mixture was diluted in MeOH (60 mL) before adding K₂CO₃ (0.11 equiv., 0.020 g, 0.145 mmol). The mixture was stirred 4 h at 0°C until completion of reaction. The reaction was then quenched by the addition of NaHCO₃ (50 mL, aq.) and diluted with water (30 mL). The aqueous phase was extracted 3 times with AcOEt (3×30 mL), and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before concentration to dryness under vacuum. The resulting crude was purified by flash chromatography on a silica gel (petroleum ether/AcOEt/NEt₃, 80:19:1) to obtain the expected compound **7** as a white powder (0.530 g, 52%). **R_f**: 0.42 (petroleum ether/AcOEt/NEt₃, 80:19:1). **¹H NMR** (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 0.12-0.20 (m, 54H, 6 TMS), 1.90 (bs, 2H, OH), 3.48 (dd, 2H, *J* = 3.0 Hz, 9.3 Hz, H₂, H₂), 3.49-3.52 (dd, 2H, H₄, H₄), 3.65-3.71 (m, 4H, H₆, H₆), 3.83-3.93 (m, 4H, H₃, H₃, H₅, H₅), 4.96 (d, 2H, H₁, H₁). **¹³C NMR** (75.46 MHz, MeOD) δ (ppm): 0.3, 1.2, 1.6 (6 TMS), 61.7 (C₆, C₆), 72.5, 74.4, 74.9 (C₂, C₂, C₃, C₃, C₄, C₄), 74.0 (C₅, C₅), 95.5 (C₁, C₁).

2.9. Synthesis of compound 8: 2,2',3,3',4,4',6'-hepta-O-(trimethylsilyl)-α,α'-D-trehalos-6-yl 3-[3'-O-(tert-butyl)dimethylsilyl]-5'-{4-[(dodecylcarbamoyloxy)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-5'-deoxythymidin-3-yl] propanoate

To a solution of **6** (1.5 equiv., 0.175 g, 0.24 mmol) in anhydrous DCM (3 mL) and under argon were sequentially added **7** (1 equiv., 0.126 g, 0.16 mmol), DCC (1.5 equiv., 0.050 g, 0.24 mmol) and DMAP (0.5 equiv., 0.010 g, 0.08 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature until completion of reaction. The precipitate was filtered and washed with DCM followed by concentration to dryness of the filtrate under vacuum. The resulting crude was purified by flash chromatography on a silica gel (petroleum ether/EtOAc, 75:25) to obtain the expected compound **8** as a white powder (0.147 mg, 41 %). **R_f**: 0.49 (petroleum ether/EtOAc, 75:25). **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): -0.01-0.21 (m, 60H, CH₃-Si et OTMS), 0.78-0.93 (m, 12H, CH₃ lipid et ^tBu), 1.15-1.32 (m, 18H, CH₂ lipid), 1.36-1.51 (m, 2H, CH₂-CH₃ lipid), 1.87 (s, 3H, CH₃ thymidine), 1.96-2.13 (m, 1H, H₂), 2.17-2.31 (m, 1H, H₂), 2.60-2.75 (m, 2H, H_B linker), 3.04-3.16 (m, 2H, CH₂-NH lipid), 3.34-3.51 (m, 4H, H_A linker et H₂ trehalose, H₂ trehalose), 3.60-3.74 (m, 2H, H₆ trehalose), 3.77-4.33 (m, 10H, H₄, H₆ trehalose, H₃ trehalose, H₃ trehalose, H₄ trehalose, H₄ trehalose, H₅ trehalose, H₅ trehalose et OH trehalose), 4.39-4.47 (m, 1H, H₃), 4.55-4.61 (m, 2H, H₅), 4.83-

4.91 (d, 2H, H_i trehalose, H_{i'} trehalose), 4.93-5.02 (m, 1H, NH lipid), 5.13 (s, 2H, O-CH₂ triazole), 6.19 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H₁), 6.63 (s, 1H, H₆), 7.69 (s, 1H, CH triazole). ¹³C NMR (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm): -4.7 (CH₃-Si), -4.5 (CH₃-Si), 0.5 (OTMS), 1.2 (OTMS), 1.5 (OTMS), 13.3 (CH₃ thymidine), 14.5 (CH₃ lipid), 18.6 (C_q ^tBu), 23.6 (CH₂ lipid), 25.9 (CH₃ ^tBu), 26.2 (CH₂ lipid), 26.6 (CH₂ lipid), 27.7 (CH₂ lipid), 30.2 (CH₂ lipid), 30.3 (CH₂ lipid), 30.6 (CH₂ lipid), 30.7 (CH₂ lipid), 32.9 (CH₂-CH₃ lipid), 33.1 (CH₂-B linker), 34.6 (CH₂ lipid), 38.2 (CH₂-A linker), 40.2 (C₂'), 41.7 (CH₂-NH lipid), 52.0 (C₅'), 58.2 (O-CH₂ triazole), 61.6 (C₆' trehalose), 64.9 (C₆ trehalose), 71.6, 72.4 (C₂ trehalose, C₂' trehalose), 73.0 (C₅' trehalose), 73.5 (C₃'), 73.7 (C₅ trehalose), 73.8, 74.4, 74.6, 74.7 (C₃ trehalose, C₃' trehalose, C₄ trehalose, C₄' trehalose), 85.9 (C₄'), 88.2 (C₁'), 95.2, 95.4 (C₁ trehalose, C₁' trehalose), 111.0 (C₅), 126.7 (CH triazole), 136.5 (C₆), 144.7 (C triazole), 151.6 (C=O thymidine), 158.1 (C=O lipid), 164.8 (C=O thymidine), 172.6 (C=O linker). HRMS (ESI) [M+H⁺]: calcd = 1477.77427, found = 1477.77674.

2.10. Synthesis of compound 9 (GNL): 5'-{4-[(dodecylcarbamoyloxy)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-5'-deoxythymidin-3-yl propanoate

To a solution of **8** (1 equiv., 0.105 g, 0.07 mmol) in MeOH (20 mL) was added Dowex 50WX2-100 ion exchange resin (0.350 g). The mixture was stirred 15 minutes at room temperature until completion of reaction. The mixture was then filtered and the filtrate was evaporated under vacuum. Purification of compound **9'** (0.062 g, 85%) was not necessary and it was directly engaged in the next reaction after drying. To a solution of **9'** (1 equiv., 0.062 g, 0.06 mmol) in anhydrous THF (3 mL) and under argon at 0°C was added TBAF (1 equiv., 62 μL, 0.06 mmol). The mixture was stirred 2 h at 0°C until completion of reaction. The reaction was quenched by the addition of water (5 mL, aq.). The aqueous phase was extracted three times with DCM (3×10 mL), and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ before concentration to dryness under vacuum. The resulting crude was purified by flash chromatography on a silica gel (DCM/MeOH/Water, 80:18.5:1.5) to obtain the expected compound **9** as a white powder (0.029 g, 52%). R_f: 0.31 (petroleum ether/AcOEt/NEt₃, 80:18.5:1.5). ¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 0.84-0.98 (m, 3H, CH₃ lipid), 1.18-1.40 (m, 18H, CH₂ lipid), 1.41-1.55 (m, 2H, CH₂-CH₃ lipid), 1.92 (s, 3H, CH₃ thymidine), 2.21-2.39 (m, 2H, H₂), 2.65 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H_B linker), 2.99-3.09 (m, 2H, CH₂-NH lipid), 3.25-3.37 (m, 6H, H₂ trehalose, H₂' trehalose, H₃ trehalose, H₃' trehalose, H₄ trehalose et H₄' trehalose.), 3.45 (q, *J* = 3.9 Hz, 9.9 Hz, 2H, H₆' trehalose), 3.70-3.80 (m, 1H, H₅' trehalose), 3.97-4.05 (m, 1H, H₅ trehalose), 4.11-4.36 (m, 5H, H₄, H_A linker, H₆ trehalose), 4.36-4.44 (m, 1H, H₃'), 4.65-4.79 (m, 2H, H₅'), 4.83-5.02 (d, 2H, H_i trehalose H_{i'} trehalose), 5.10 (s, 2H, O-CH₂ triazole), 6.15 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H₁), 7.23 (s, 1H, H₆), 8.00 (s, 1H, CH triazole). ¹³C NMR (75.46 MHz, MeOD) δ (ppm): 13.1 (CH₃ thymidine), 14.3 (CH₃ lipid), 23.2 (CH₂ lipid), 25.4 (CH₃ ^tBu), 29.6 (CH₂ lipid), 29.6 (CH₂ lipid), 29.9 (CH₂ lipid), 30.0 (CH₂ lipid), 30.2 (CH₂ lipid), 30.2 (CH₂ lipid), 30.2 (CH₂ lipid), 32.4 (CH₂-CH₃ lipid), 32.8 (CH₂-B linker), 34.6 (CH₂ lipid), 34.8 (CH₂-A linker), 37.8 (C₂'), 39.4 (CH₂-NH lipid), 51.9 (C₅'), 62.2 (O-CH₂ triazole), 63.2 (C₆' trehalose), 64.9 (C₆ trehalose), 69.2, 70.6 (C₂ trehalose, C₂' trehalose), 70.9 (C₅' trehalose), 71.2 (C₃'), 71.5 (C₅ trehalose), 72.3, 73.0, 73.6, 73.8 (C₃ trehalose, C₃' trehalose, C₄ trehalose, C₄' trehalose), 84.6 (C₄'), 87.3 (C₁'), 94.3, 95.5 (C₁ trehalose, C₁' trehalose), 110.8 (C₅), 125.3 (CH triazole), 136.9 (C₆), 145.1 (C triazole), 151.2 (C=O thymidine), 155.6 (C=O lipid), 164.2 (C=O thymidine), 172.3 (C=O linker). HRMS (ESI) [M+H⁺]: calcd = 931.45356, found = 931.64586.

2.11. Synthesis of compound 10 (dATr): 6,6'-Bis-O-dodecanoyl-α,α'-D-trehalose

To a solution of lauric acid (2 equiv., 0.104 g, 0.52 mmol) in anhydrous DCM (3 mL) and under argon were sequentially added **7** (1 equiv., 0.200 g, 0.26 mmol), DCC (2 equiv., 0.106 g, 0.52 mmol) and DMAP (0.5 equiv., 0.016 g, 0.13 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature until completion of reaction. The precipitate was filtered

and washed with DCM followed by concentration to dryness of the filtrate under vacuum. The resulting crude was purified by flash chromatography on a silica gel (petroleum ether/EtOAc, 75:25) to obtain the expected compound **7'** as a white powder (0.254 mg, 86 %). To a solution of **8'** (1 equiv., 0.254 g, 0.22 mmol) in MeOH (40 mL) was added Dowex 50WX2-100 ion exchange resin (0.700 g). The mixture was stirred 15 min at room temperature until completion of reaction. The mixture was then filtered and the filtrate was evaporated under vacuum. Purification of compound **10** (0.143 g, 91%) was not necessary and it was directly engaged in the next reaction after drying. **R_f**: 0.49 (petroleum ether/EtOAc, 75:25). **¹H NMR** (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 0.70-0.82 (m, 3H, CH₃ lipid), 1.03-1.25 (m, 32H, CH₂ lipid), 1.28-1.42 (m, 4H, CH₂-CH₃ lipid), 3.15-3.26 (m, 4H, CH₂-C=O lipid), 3.50 (dd, 2H, *J*= 3.1 Hz, 9.2 Hz, H₂, H_{2'}), 3.49-3.58 (m, 2H, H₄, H_{4'}), 3.63-3.70 (m, 4H, H₆, H_{6'}), 3.83-3.90 (m, 2H, H₃, H_{3'}), 3.92-4.02 (m, 2H, H₅, H_{5'}), 4.96 (d, 2H, H₁, H_{1'}). **¹³C NMR** (75.46 MHz, MeOD) δ (ppm): 13.8 (CH₃ lipid), 20.5 (CH₂ lipid), 24.7 (CH₂ lipid), 30.1 (CH₂ lipid), 30.5 (CH₂ lipid), 30.6 (CH₂ lipid), 30.6 (CH₂ lipid), 30.9 (CH₂ lipid), 30.9 (CH₂-CH₃ lipid), 31.1 (CH₂ lipid), 31.5 (CH₂ lipid), 61.7, 61.8 (C₆, C_{6'}), 71.3, 72.5, 74.4 (C₂, C_{2'}, C₃, C_{3'}, C₄, C_{4'}), 74.9 (C₅, C_{5'}), 95.5 (C₁, C_{1'}).

2.12. General procedure for nanoparticles and solid lipid nanoparticles preparation

Resomer® RG 503H PLGA (Sigma-Aldrich, 719870) was used with a lactide-glycoside ratio of 50:50, molecular weight 24000 to 38000. Nanoprecipitation protocol was adapted from a previous study to prepare NP suspensions [16]. Briefly, 31 mg of Resomer® RG 503H PLGA was dissolved in 3.1 mL of tetrahydrofuran (THF, Sigma-Aldrich, 401757). 200 μ l of this stock solution were quickly added to 20 mL of deionized water under sonication (37Hz, 100%, 3 min). The resulting NP suspension was then slowly concentrated by centrifugation using 10 kDa centrifugal filters (Merck Millipore, Amicon Ultra centrifugal Filter) for 21 min at 5 000 RPM (Centrifuge 5804 R, Eppendorf). Once the supernatant was collected, the resulting suspension was ready for use (typical concentration of NPs ~ 0.2 mg.mL⁻¹). Rapid mixing protocol was adapted from literature to prepare NP suspension. 500 μ L of the previously prepared stock solution were simultaneously injected (3 mL.min⁻¹) with 1.5 mL of deionized water (9 mL.min⁻¹) using syringe pumps (kdScientific, USA). The obtained suspension of PLGA NPs was then slowly concentrated to provide a sample with a typical concentration of 2.5 mg.mL⁻¹. As UT conditions, PLGA NPs containing Nile Red fluorophore (Sigma-Aldrich, 19123) were formulated similarly, except that 0.9 mg of Nile Red was introduced in the polymer stock solution. **F2** and **F3** were formulated similarly, except that 15% (w/w) of **dATr** or **GNL** were introduced in the stock solution. For all experiments, PLGA NP suspensions were prepared extemporaneously.

2.13. Nanoparticles and solid lipid nanoparticles characterization and stability evaluation

Granulometric profile of NPs and SLNs were acquired by Dynamic Light Scattering (DLS), using Malvern Instruments (Zetasizer Nano ZS). NPs / SLNs were diluted at 1:1000 (v/v), then the average size and the polydispersity index were obtained in triplicate at 25 °C. To determine the Zeta potential, NPs / SLNs, at the same dilution, were analyzed using Zetasizer Nano ZS coupled with Folded Capillary Cell (DTS1060). Short term stability assessment was performed during 1 month by checking visually the lack of creaming or phase separation and monitoring the size and zeta potential. Transmission electron microscopy was carried out using a Hitachi (Tokyo, Japan) coupled to an ORIUS SC1000 11MPX (Gatan, USA). All samples were deposited on carbon-coated grid (Delta Microscopies, France) and dried after 3 min of contact. A staining procedure using uranylless (Delta Microscopies, France) or nanotungstene was used.

2.14. Quantification of the free GNL by enzymatic assay

Quantification of the free GNL in the suspensions of trehalose derivative-loaded NPs was performed using the Megazyme microplate assay procedure (Trehalose Assay Kit, Megazyme, Ireland) [30]. Briefly, trehalose standard solutions (concentration between 25 and 100 μM) were prepared and 20 μL of each was used for the calibration curve. To these 20 μL were added 200 μL of deionized water, 20 μL of solution 1 (buffer), 10 μL of solution 2 (containing both NADP^+ and adenosine 5' triphosphate) and 2 μL of solution 3 (containing the hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase). The solutions were mixed and the absorbance was measured at 340 nm (abs_0) before addition to the trehalase medium. The next step was the addition of 2 μL of suspension 4, containing trehalase, to the wells. The 96-well plate was shaken and incubated for 8 min at room temperature before reading the absorbance of the different solutions at 340 nm (abs_1). The calibration curve was thus obtained by representing the background-corrected absorbance ($\text{abs}_1 - \text{abs}_0$) as a function of the trehalose concentration. For the quantification of the NPs samples, the same protocol was used except for the direct use of 220 μL of suspension instead of 20 μL of standard and 200 μL of deionized water, to ensure absorbances included in the calibration range.

2.15. Encapsulation efficiency and drug loading

For the determination of the encapsulation efficiency (EE) and the drug loading (DL) of PLGA NPs, GNL quantification was achieved by UV-Vis spectroscopy (Jasco V-630, France) using a standard calibration curve of GNL dissolved in methanol (between 5 and 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; absorbance at 266.5 nm). The following equation: $y = 0.0088x + 0.1572$ (1) was used, where y is the absorbance value and x the GNL concentration. The standard calibration curve was linear over the range of 5 - 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with $r^2 = 0.9993$. The amount of encapsulated GNL in the PLGA NPs (also called DL) was calculated from the mass of the incorporated drug using the following formula:

$$\text{DL} = \frac{\text{Amount of GNL in NPs}}{\text{Amount of GNL loaded NPs}} \times 100 \quad (2)$$

The drug EE was defined as the ratio of the mass of the encapsulated drug on the mass of the drug used for the formulation using the following equation:

$$\text{EE} = \frac{\text{Amount of encapsulated GNL}}{\text{Amount of GNL used for NP formulation}} \times 100 \quad (3)$$

The drug EE and the DL efficiency were calculated using the equations 1, 2 and 3.

2.16. Infrared analyses

Spectra of PLGA, GNL, F1 and F3 were acquired using a FT-IR spectrometer (FT-IR 4600, Jasco Inc., Tokyo, Japan) controlled by spectra manager software. Samples (3 mg) were mixed with 300 mg of KBr powder and then compressed with a mechanical die press to obtain translucent pellets. All spectra were recorded after averaging 16 accumulations with 8 cm^{-1} resolution between 4000 cm^{-1} and 450 cm^{-1} . Background was performed on the atmosphere and subtracted to all acquisition. All spectra were acquired in the transmittance mode. IR data were processed using spectra manager for IR spectra and IR derivative (Savitzky-Golay: derivative order 1, polynome order 2 and window of 7 points).

2.17. Cell culture and cell viability assay

BE(2)-M17 cell lines (human neuroblastoma) were obtained from ATCC (CRL-2267) and grown in OPTIMEM (Life Technologies, 31985-047) adding 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin/streptomycin. For all experiments, NP and SLN

suspensions were used as freshly prepared and cells were grown at 70% to 80% confluence. Cells were treated for 24 h or 48 h with 0.5 μL of loaded NPs and SLNs. Each experiment was reproduced at least three times. Cell viability was estimated by MTS assay (ATCC/LGC Promochem) following manufacturer instructions.

2.18. Western Blot analysis

BE(2)-M17 cells were seeded on 6-well plates (NUNC) and grown to 70-80% confluence per well before being treated with **F1**, **F2**, **F3** and **F4**. The cells were then transferred to Eppendorf tubes before centrifugation for 5 min at 3000 rpm and 4°C. The supernatant was removed before the dropwise addition of 50 μL of P/X solution (P/X= 1.5 mL RB1X, 0.450 mL P4X, 0.050 mL DTT) under mechanical agitation. The samples were then incubated for 5 min at 100°C. Protein samples were loaded into 18% acrylamide gels and separated by SDS-PAGE before transfer to a nitrocellulose membrane (0.2 μm - Biorad - USA). The membranes were then blocked in 5% PBS-milk buffer before overnight incubation at 4°C with rabbit anti-LC3 primary antibody (1/1000°, Novus Biological, #NB100-2220). An incubation with mouse anti-actin antibody (1/5000°, Sigma) served as a loading control. The appropriate secondary antibodies were then used before revelation with the revelation kit (Super Signal West Pico Chemiluminescent kit - Immobilon Western, Chemiluminescent HRP substrate, Millipore). Chemiluminescence images were acquired using a ChemiDoc+XRS analysis system (BioRad). The signal per well was quantified using ImageJ software and normalized by actin before statistical analysis.

2.19. Immunostaining and imaging

For all experiments, NP suspensions were used as freshly prepared. For Nile Red-loaded NP internalization and colocalization imaging assays, cells were trypsinized and replated in 6-well plates (NUNC) with coverslips. BE(2)-M17 cells were grown at 70% to 80% confluence per well. Once cells were attached, they were exposed 24 h at 37°C to the different formulations. **F5** was added at a final concentration of $\sim 3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of NP. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C then washed with PBS 1X. Cell permeabilization and blocking steps were realized by addition of a mixture composed of 5 mL of PBS 1X, 450 μL of normal goat serum and 225 μL of triton. Lysosomes were marked with the LAMP2 (Mx, H4B4) antibody overnight at 4°C and staining was revealed with appropriate secondary antibody conjugated with GAM 488 (Life Technologies). For cytoplasm and nuclei staining, the cells were incubated for 8 min at room temperature with 8 μM Hoechst dye (ThermoFisher Scientific, #33342) prior to mounting. Slices were air-dried and mounted on #1.5 coverslips with Dako fluorescent mounting medium and left to dry overnight in darkness. Image stacks (pixel size $\sim 100 \text{ nm}$, z-step 0.3 μm) were acquired on a Leica TCS SP8 microscope laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems) using a 63X Plan Apo CS oil immersion objective. Nile Red was detected by using excitation wavelength of 568 nm (DPSS laser) and with a detection window between 570 and 590 nm. Lysosome were detected by using excitation wavelength at 488 nm (argon laser) and with a detection window between 545 and 605 nm. Cells without loaded NP treatments were used in parallel as autofluorescence controls using the corresponding excitation and detection wavelengths. Images were analyzed with LAS AF v2.6 acquisition software equipped with HCS-A module (Leica Microsystems). Nile Red intensity relative to cell surface was quantified with Definiens XD Developer v2.5 software (Definiens). Colocalization, fluorescence profiles, orthogonal projections and maximal intensity projections were obtained with the ImageJ (NIH) software distribution Fiji.

2.20. GFP-LC3 Reporter Autophagy assay

To assess autophagy activity, the GFP-LC3 reporter was used as previously described [26,31]. Briefly, BE(2)-M17 cell line was plated on coverslips in 12-well plates and were transfected with mCherry-GFP-LC3 plasmid at 1.6 μg DNA using PEI-mediated transfection. Cells were maintained for 24 h at 37°C in 5% CO₂ before being treated with unloaded or loaded NPs or SLNs for 24 h at 1:1,000. Cell coverslips were fixed at 4°C for 20 min using 4% paraformaldehyde. The fixed cells were washed 3 times with PBS 1X for 5 min each time. Cell coverslips were finally stained with DAPI solution (Invitrogen) at 10 μM for 8 min before long washes in PBS 1X. Coverslips were mounted onto slides using mounting solution (Dako), and image acquisitions were made on a wide-field Olympus Epifluorescent Microscope (BX3-CBH) coupled with Hamamatsu camera (ORCA-Flash 4.0 LT). Images were deconvolved using the cellSens Dimension software. Image analysis was performed using Fiji/ImageJ software.

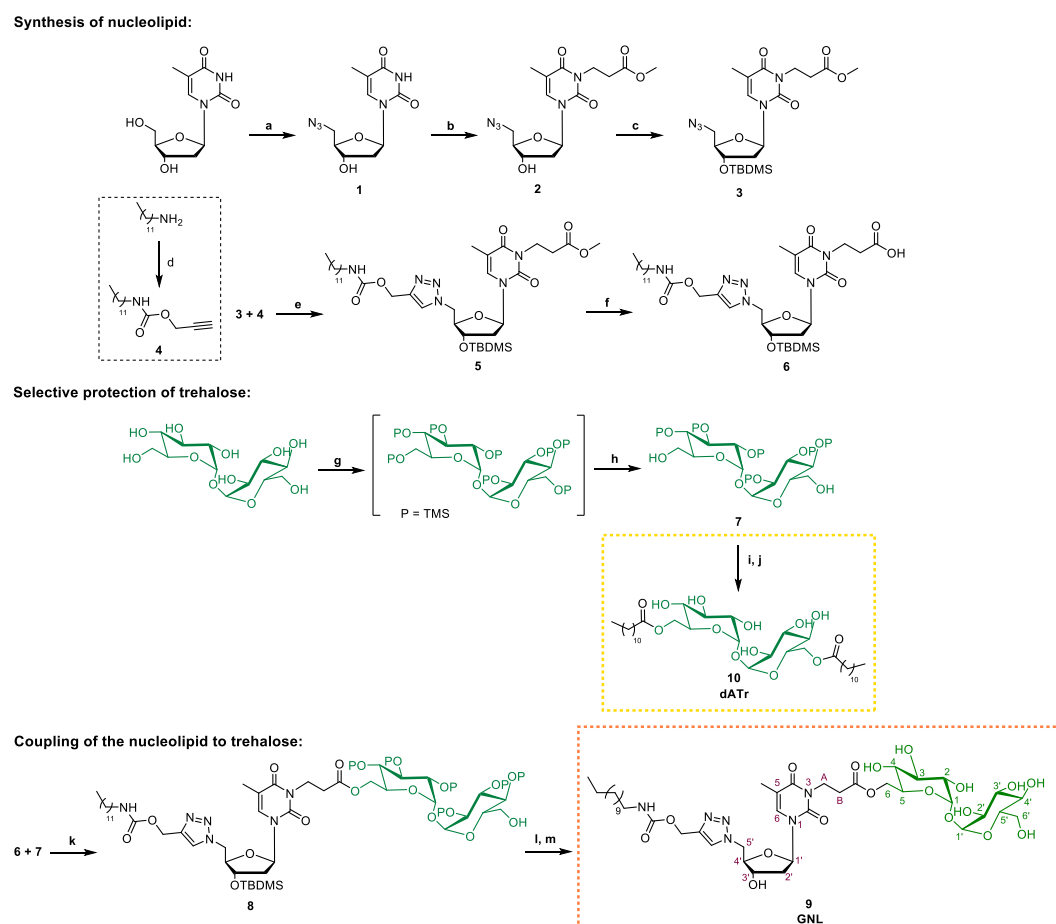
2.21. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software. For functional assays, statistical significance of the data was evaluated after a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test. The level of significance was set at $p < 0.05$. Data of **Figure 3A-C** appeared as estimation graphics called 'Gardner-Altman plots': on top graph, data of **UT, F1, F2, F3** and **F4** groups were presented as scatter plot showing the observed values along with above defined descriptive statistics (mean \pm standard deviation). Below each graph, a contrast graph using the difference axis to display an effect size, here mean difference. Vertically aligned with the mean of the **UT** group, the mean difference is indicated by the black circle. The 95% confidence interval (CI) of the mean difference was illustrated by the black vertical line. The curve indicated the resampled distribution of the effect size, given the observed data.

3. Results and discussion

3.1. Design and synthesis of glyconucleolipidic platforms.

Two original compounds, a diacyl trehalose derivative (**dATr**, compound **10**) and a glyconucleolipid (**GNL**, compound **9**) composed of single C12 lipid chain featuring trehalose as the carbohydrate moiety, were designed and synthesized (**Scheme 1**). **GNL** was synthesized by a ten steps synthesis route beginning with the functionalization of commercially available thymidine. In the first step, an azide group was introduced at the 5' position of the nucleoside through an Appel reaction followed by a nucleophilic displacement of the bromine atom with NaN₃ to form the azidothymidine **1**. The linker, coupling the NL moiety to trehalose, was added by a Michael reaction to form **2**. After protecting the 3' position of thymidine. **3** was submitted to a CuAAC reaction with the previously prepared propargylated lipid chain **4** to give the corresponding 1,2,3-triazole derivative **5**. The latter was saponified in basic medium, followed by esterification with the per-silylated trehalose **7** leading to compound **8**. NLs were coupled to trehalose through an ester moiety allowing its enzymatic release in neuronal cells once transportation through the lipid bilayers has been achieved. Deprotection of the silyl groups under acidic conditions yielded the final **GNL** structure. Compound **10** (**dATr**) was obtained by a selective protection of trehalose dihydrate **7**, followed by an esterification step to append the lauric chain and followed by a deprotection step by means of a Dowex 50WX2-100 ion exchange resin.



Scheme 1. Synthetic route leading to GNL and trehalose derivative. Reagents and conditions: **a** – 486
 PPh₃ (1.2 equiv.), NaN₃ (5 equiv.), CBr₄ (1.2 equiv.), anhydrous DMF, 24 h, RT, 74%; **b** – DBU (1.55 487
 equiv.), methyl acrylate (1.55 equiv.), anhydrous DMF, 16 h, 60 °C, 66%; **c** – TBDMSCl (1.2 equiv.), 488
 imidazole (1.2 equiv.), anhydrous DMF, 15 h, RT, 86%; **d** – triethylamine (1.05 equiv.), propargyl 489
 chloroformate (1 equiv.), anhydrous DCM, 3 h, 0 °C, 97%; **e** – CuSO₄ · 5H₂O (0.1 equiv.), sodium 490
 ascorbate (0.2 equiv.), THF/H₂O (1 : 1), 15 h, 60 °C, 87%; **f** – NaOH (1N) in anhydrous methanol, 491
 anhydrous 1,4-dioxane, 15 h, RT, 73%; **g** – N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide (8.6 equiv.), TBAF (0.06 492
 equiv.), anhydrous DMF, 15 h, RT; **h** – K₂CO₃ (0.11 eq.), anhydrous MeOH, 4 h, 0 °C, 52%; **i** – lauric 493
 acid (2 equiv.), DCC (2 equiv.), DMAP (0.5 equiv.), anhydrous DCM, 16 h, RT, 86%; **j** – Dowex 494
 50WX2-100, anhydrous MeOH, 30 min., RT, 91%; **k** – nucleolipid (1.5 equiv.), DCC (1.5 equiv.), 495
 DMAP (0.5 equiv.), anhydrous DCM, 16 h, RT, 41%; **l** – Dowex 50WX2-100, anhydrous MeOH, 15 496
 min, RT, 85%; **m** – TBAF (1 equiv.), anhydrous THF, 2h, 0 °C, 52%. 497

3.2. Physico-chemical characterization of PLGA nanoparticles and solid lipid nanoparticles. 498

To evaluate either the added value to link trehalose to a NL and the PLGA NPs as a 499
 nanocarrier, five formulations were prepared. First, we used unloaded PLGA NPs (**F1**) as 500
 a control. Second, **dATr** was formulated into PLGA NPs, named **dATr**-loaded PLGA NPs 501
 (**F2**) and **GNL** was also formulated into PLGA NPs, described as **GNL**-loaded PLGA NPs 502
 (**F3**). By comparing **F2** and **F3**, we were able to have insight on the contribution of NLs. 503
 Third, to assess whether a PLGA-free formulation was appropriate as a PLGA alternative, 504
 we took advantage of the self-assembling properties of **GNLs** to formulate them into SLNs 505
 [13,14](**F4**). Finally, Nile Red-loaded PLGA NPs (**F5**) were prepared as an experimental 506
 read-out to evaluate exclusively the internalization into neuronal cells (**Figure 1**). 507

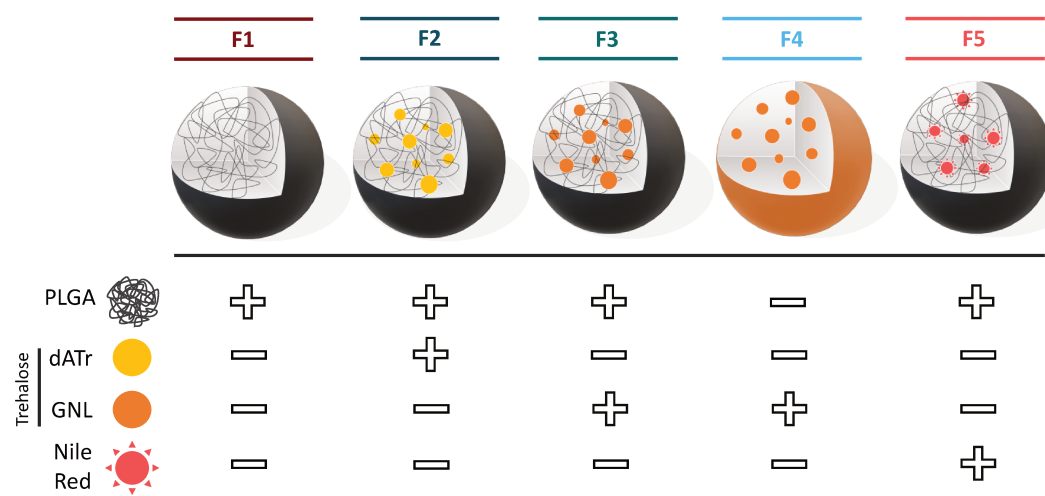


Figure 1. Schematic illustration of the nanoparticle compositions

These nanovectors were first obtained by nanoprecipitation, and then by rapid mixing. Nanoprecipitation requires the addition of two miscible solvents, in this case THF and water, and results in the spontaneous formation of NPs on phase separation. With dissolved PLGA and active compounds (for loaded NPs), the organic phase was added dropwise to the aqueous medium under sonication. Once the nanocarriers were formed, the particle dispersions were further processed to purify and concentrate them through THF rotary evaporation and dialysis. The main drawback of this method was the loss of product due to the aggregation of PLGA during the process, and therefore, the low yield of production. On the other hand, rapid mixing involves the simultaneous injection of an organic phase (THF) and the aqueous medium using a syringe pump [30]. Compared to nanoprecipitation, the rapid mixing has multiple advantages such as quicker formulation of smaller nano-objects, allowing obtaining them in 15 min instead of 45 min in the case of nanoprecipitation, and at a higher concentration ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of NPs using nanoprecipitation *versus* $2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ using rapid mixing). Both trehalose derivatives were successfully incorporated into PLGA NPs or able to form SLNs. Therefore, three different formulations (F1, F2, F3) were prepared by both nanoprecipitation and rapid mixing to observe the process impact on the physico-chemical characteristics (size, polydispersity index (monodisperse suspension under 0.2) and zeta potential) (Table 1).

Table 1. Physicochemical properties of GLN nanoformulations function of the formulation process.

		F1	F2	F3	F4
Nano-precipitation	Diameter (nm)	182.0 ± 0.8	190.7 ± 1.8	180.4 ± 1.4	N.A.
	Polydispersity index	0.144	0.135	0.174	N.A.
	ζ -potential (mV)	-31.8 ± 9.6	-45.4 ± 1.6	-58.1 ± 0.9	N.A.
Rapid mixing	Diameter (nm)	97.6 ± 17.2	156.2 ± 5.6	167.2 ± 2.4	120.4 ± 1.4
	Polydispersity index	0.147	0.198	0.202	0.228
	ζ -potential (mV)	-47.3 ± 2.0	-38.9 ± 8.9	-35.1 ± 0.6	-16.2 ± 1.7

A significant decrease (student's test, $p < 0.05$) in the mean diameter was observed for the 3 formulations (F1/F2/F3) using rapid mixing after dialysis. Another advantage of this approach was obtaining new nano-objects only made of GNL, *i.e.* SLN. They were formulated following the same protocol as the PLGA NPs except for the polymer addition phase. These SLNs with a diameter of $120.4 \pm 1.4 \text{ nm}$ had a surface charge of $-16.2 \pm 1.7 \text{ mV}$. The colloidal stability of the formulations obtained by rapid mixing was evaluated at

4°C (storage condition) and 37°C (use condition). The objects were stable for at least 20 days at 4°C, whereas at 37°C, a destabilization, characterized by an increase of the diameter (10-fold) and polydispersity, were observed from 10 days. However, the *in vitro* biological analyses were carried out only during 3 days, ensuring the object stability (Figure 2).

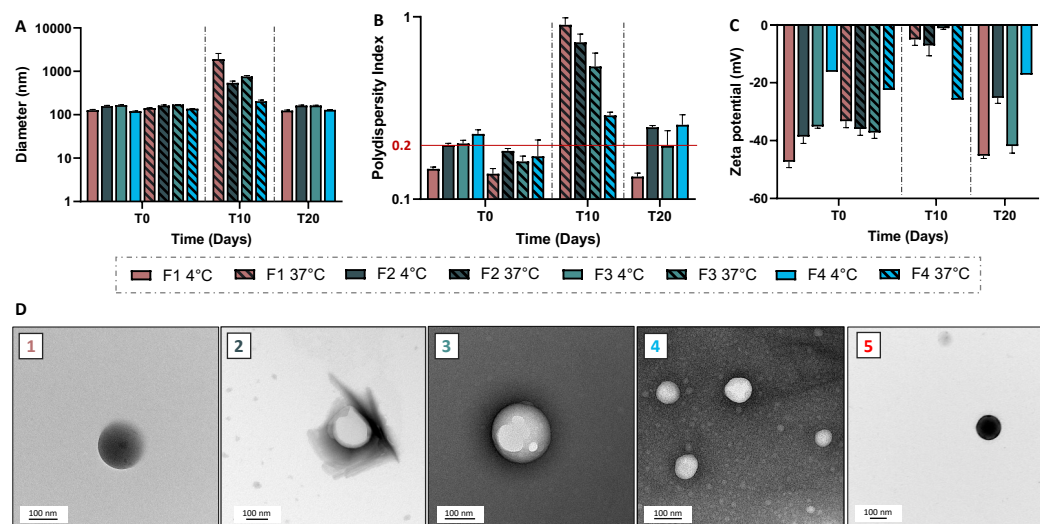


Figure 2. Physicochemical characterization of the rapid mixing formulations. Evolution of (A) the diameter, (B) polydispersity index (PdI), and (C) ζ -potential of F1, F2, F3, and F4 overtime at 4°C and 37°C. (E) TEM images of (1) F1, (2) F2, (3) F3, (4) F4 and (5) F5 prepared by rapid mixing.

To dig deeper into the characterization of these nano-objects, two techniques were used: transmission electron microscopy (TEM) and infrared (IR) spectroscopy. The first one confirmed the size of the particles and their spherical shape (Figure 2D). The advantage of this study was obvious in the case of F5. Indeed, the study by DLS of this formulation containing Nile Red was not possible owing to the similarity in color between the chromophore and the used laser. TEM was therefore able to overcome this limit allowing the observation of spherical objects with an average diameter of 118.8 ± 25.8 nm consistent with the results obtained for other PLGA NPs. The second confirmed the presence of GNL in the NPs. From the results of IR studies, specific bands for each compound (PLGA and GNL) were identified (Table 2). These specific vibrations were also observable for the nano-objects, highlighting the presence of both PLGA and GNL (Supporting information Figure S1).

Table 2. Specific chemical bonds for PLGA, GNL, F1, and F3 in IR spectroscopy.

Chemical bond (cm ⁻¹)	PLGA	GNL	F1	F3
O-H	3504.0	3388.3	3507.9	3507.9
C-H	2998.8 – 2883.1	2925.4/2854.1	2994.9 – 2854.1	2996.8 – 2854.1
C=O	1760.7	1702.8/1666.2/1637.3	1760.7	1760.7/1666.2/1639.2
N=N	N.A.	1537.0	N.A.	1535.1 (shoulder)
C=C	N.A.	1469.5	N.A.	N.A.
C-O	1454.1/1425.1/1396.2	1365.4 – 1047.2	1456.0/1425.1/1394.3	1454.1/1425.1/1394.3

Due to the low proportion of GNL in the NPs, the band intensity was low. The $\nu_{N=N}$ band was overlaid by other signals ($\nu_{C=C}$) leading to the observation of a shoulder. Signal deconvolution using Savitzky-Golay derivative was employed to separate signals from each pure compound (PLGA and GNL). Focusing on GNL molecule and based on its first

derivative spectrum, 5 specific signals (C=O, N=N, and C-O elongation vibrations, **Table 2**) were identified for **GNL** loaded PLGA NPs. This result corroborated those obtained with the IR spectra and increased the number of signals related to the active compound. It confirmed the presence of **GNL** in the PLGA NPs even if at low concentration.

3.3. GNL quantification in PLGA nanoparticles.

Two quantification approaches were used to i) quantify the free (or non-encapsulated) **GNL** and ii) quantify the encapsulated **GNL**. The strategy for the free **GNL** was based on an enzymatic assay with UV quantification [32]. Indeed, the use of trehalase allowed splitting the trehalose into two glucose units which, after enzymatic reactions, enabled a detection at 340 nm. In the case of PLGA NP loaded with **GNL**, the concentration of free **GNL** was found equivalent to zero, confirming the encapsulation of this active compound (**Supporting information Figure S2**). Regarding the DL and the drug EE, a destabilization of the nano-objects in basic conditions allowed the quantification of **GNL** by UV-Vis spectroscopy at 266.5 nm. A DL and a EE of 15% and 96% respectively were determined for **F3** and agreed with the values usually found in the literature (**Supporting information Figure S3**) [30].

3.4. Biocompatibility and Internalization of GNL Formulations.

F1, **F2**, **F3**, and **F4** cytotoxicity at low concentration (1/1000°) was assessed *in vitro* on human neuroblastoma cell lines (*i.e.*, BE(2)-M17 cells), given that previous studies showed that **F1** and **F5** were biocompatible at this concentration [16–18]. After 24 h and 48 h of exposure, no significant toxicity was observed for each formulation compared to untreated cells (**Figure 3A-B**).

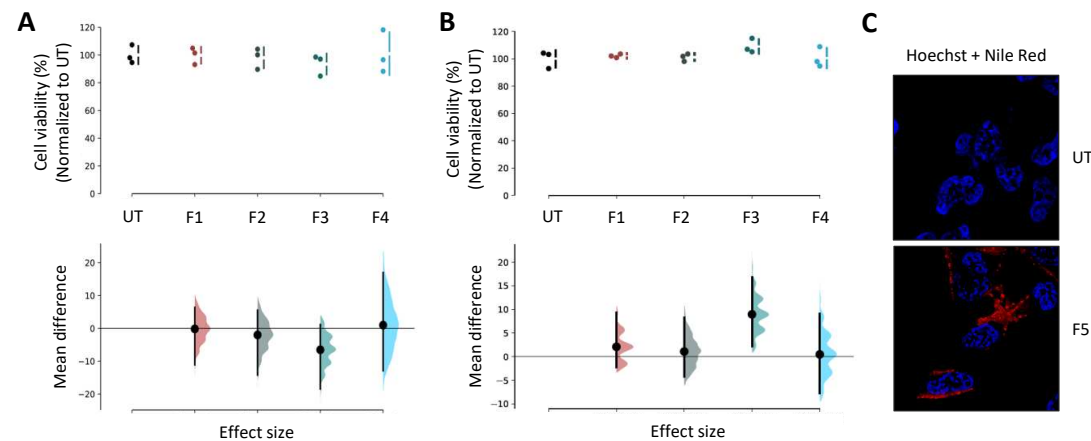


Figure 3. Biological evaluation of SLN and (un)loaded PLGA nanoparticles. (A) Cell viability evolution over time. BE(2)-M17 cells treated with **F1**, **F2**, **F3**, and **F4** compared to the untreated cells (UT) after (A) 24 h and (B) 48 h. $n=3$. * $p < 0.05$ compared with untreated cells. (C) Representative images of **F5** internalization in BE(2)-M17 cells after 24 h of exposure (1:1000). Nuclei were stained with Hoechst (blue) and **F5** was highlighted by the presence of Nile Red (red). Scale bar: 10 μm.

The next step corresponded to the evaluation of the cell internalization. As previously mentioned, a dedicated formulation containing Nile Red was prepared (**F5**) to evaluate cellular uptake. BE(2)-M17 cells (healthy neurons) were incubated in the presence of **F5** diluted 1000 times for 24 h. As previously described [16–18], PLGA NPs were internalized by cells (**Figure 3C**). Overall, the results obtained with the different formulations indicated their safety and cellular uptake at low concentration.

3.5. GNL-loaded PLGA nanoparticles activity as autophagy inducer.

The biological effects of the different formulations were further explored to monitor autophagic activity, following levels of the microtubule-associated protein, light chain 3 (LC3), a key protein in the autophagy pathway, in BE(2)-M17 healthy neuroblastoma cell line [26]. Trehalose-derivate nano-objects (F2, F3, F4, with the same concentration in trehalose) exhibited by immunoblot an accumulation of autophagosomes (APs) after exposure, compared to untreated (UT) cells, as indicated by increased levels of the AP marker LC3B-II in the cells (Figure 4A).

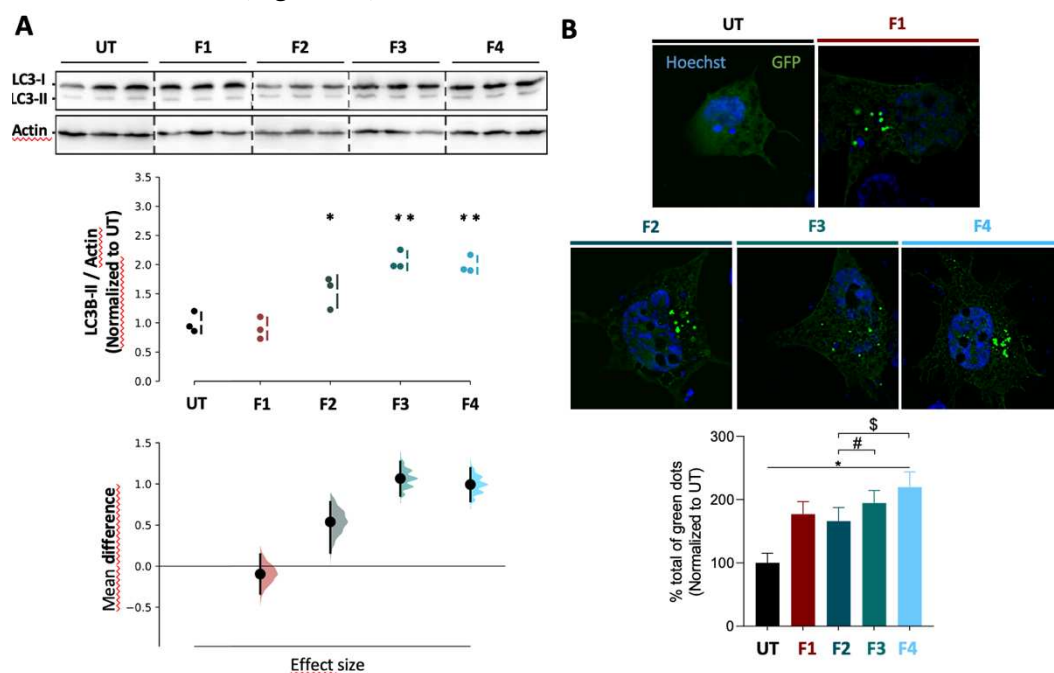


Figure 4. Biological evaluation of SLN and (un)loaded PLGA nanoparticles. (A) Immunoblot representative images and quantification of LC3 protein levels normalized by actin in BE (2)-M17 cells treated with F1, F2, F3 or F4 for 24 h (1:1 000). n=3. *p < 0.05 compared with untreated cells. (B) Quantification and images of LC3-positive dots per cell in BE (2)-M17 cells transfected with a GFP-LC3 plasmid for 24 h and treated with F1, F2, F3 or F4 for 24 h (1:1 000). Scale bar: 10µm. *p < 0.05 compared with untreated cells. n=20.

In particular, F2 resulted in a 1.5-fold increase, while F3 and F4 significantly increased up to two-fold compared to UT conditions. These effects might be explained by the amphiphilic nature of NL and their resemblance to the lipid bilayer that composes cell membranes. NLs could cross the cell membrane more easily with or without the help of membrane transporters. These results indicated the beneficial effect to functionalize the trehalose with a NL. The capacity to induce autophagy was further confirmed by immunofluorescence using a GFP-LC3 construct, which allowed the identification of AP-related vesicles. Further supporting an accumulation of AP in F2, F3 and F4-treated cells, GFP-positive vesicles were markedly increased in these treated cells, indicating an increase of AP numbers (Figure 4B). Taken together, these data indicated that GNL significantly increased the autophagy in these cells.

5. Conclusions

Herein, the synthesis of a thymidine-derived GNL bearing trehalose as an active substance to study their biocompatibility and ability to induce autophagy for lysosomal impairment treatment was investigated. An amphiphilic GNL, named GNL, was designed and formulated into two different nanosystems, SLNs and PLGA NPs. These nano-objects were stable for at least 20 days at 4°C and 10 days at 37°C. The successful encapsulation

of GNL inside PLGA NPs was confirmed by IR and UV-Visible spectroscopies (DL 15% and EE 96%). Cytotoxicity evaluation of GNL-loaded PLGA NPs and GNL-based SLN on human neuronal cells showed that GNLs were biocompatible at low concentration after 24 h of exposure. The uptake of fluorophore-loaded PLGA NPs into cells indicated that PLGA NPs are successfully internalized, highlighting the contribution of PLGA NPs as drug delivery systems, as previously published. Moreover, immunoblotting and transfection assays suggested that GNL-based nanosystems improved biological activity of trehalose, thereby significantly increasing induction of autophagy flux. Interestingly, coupling trehalose to NL showed that GNLs significantly increased the activity of the active substance (two-fold) compared to the encapsulation of a lipid-trehalose derivative. These promising results suggested that GNL-based nanovectors can be efficiently uptaken by dopaminergic neurons, whose impairment is involved in neurodegenerative diseases. Therefore, further *in vitro* studies will be carried out in a PD cellular model (M17 cells overexpressing α -synuclein or BE(2)-M17 cells with depletion of lysosomal type 5 P-type ATPase (ATP13A2). *In vivo* assays will be performed to evaluate GNL-loaded functionalized NPs and their ability to cross the BBB and target neurons of interest. Indeed, Swastika et al. recently demonstrated that suitably designed NLs would pass the BBB [30], of which the tight junctions between endothelial cells greatly limit the cerebral passage of numerous compounds [33–36]. Therefore, the design and functionalization of new NL/GNLs followed by their formulation as nanoparticles would overcome this limitation and improve the bioavailability of the active substances, through an increase in stealth and their ability to target pathological sites, notably in order to modulate the pH and lysosomal activity. This concept represents a milestone in the treatment of neurodegenerative diseases that will open the field to a new minimally invasive therapeutic approach.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Infrared analysis of PLGA, GNL, and (un)loaded PLGA NPs; Figure S2: Principle of the enzymatic determination of trehalose; Figure S3: UV spectroscopy assays.

Author Contributions: A.C., J.V., M-L.T. and A.G. carried out experiments. P.B., L.L. and B.D. designed the experiments and revised the manuscript, A.C. analysed the data and wrote the manuscript; P.B. provided critical tool and reagents. P.B. and B.D. secured the funding. All authors read and approved the manuscript.

Funding: This research was funded by *Le ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation* (France). This work was supported by Fondation de France grant number 00066525, by IDEX Emergence Grant number OPE-2018-410 (B.D.) and by *Le collège des écoles doctorales (appel doctorat interdisciplinaire 2018)*.

Acknowledgments: We dedicate this article in memory of our research advisor, mentor, colleague and friend, Dr Laurent Latxague.

We thank *Bordeaux Imaging Center (BIC)* for technical support during TEM observations. We would like to thank Dr. J. Leblond Chain for her scientific advices.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Nichols, E.; Szoeke, C.E.I.; Vollset, S.E.; Abbasi, N.; Abd-Allah, F.; Abdela, J.; Aichour, M.T.E.; Akinyemi, R.O.; Alahdab, F.; Asgedom, S.W.; et al. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2019**, *18*, 88–106, doi:10.1016/S1474-4422(18)30403-4.
2. Tysnes, O.-B.; Storstein, A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **2017**, *124*, 901–905, doi:10.1007/s00702-

- 017-1686-y. 685
3. Dehay, B.; Martinez-Vicente, M.; Caldwell, G.A.; Caldwell, K.A.; Yue, Z.; Cookson, M.R.; Klein, C.; Vila, M.; Bezdard, E. Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **2013**, *28*, 725–732, doi:10.1002/mds.25462. 686
687
 4. Emanuele, E. Can Trehalose Prevent Neurodegeneration? Insights from Experimental Studies. *Curr. Drug Targets* **2014**, *15*, 551–557, doi:10.2174/1389450115666140225104705. 688
689
 5. Liu, R.; Barkhordarian, H.; Emadi, S.; Chan, B.P.; Sierks, M.R. Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 74–81, doi:10.1016/j.nbd.2005.02.003. 690
691
 6. Sarkar, S.; Davies, J.E.; Huang, Z.; Tunnacliffe, A.; Rubinsztein, D.C. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 5641–5652, doi:10.1074/jbc.M609532200. 692
694
 7. Khalifeh, M.; Barreto, G.E.; Sahebkar, A. Trehalose as a promising therapeutic candidate for the treatment of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 1173–1189, doi:10.1111/bph.14623. 695
696
 8. Tanaka, M.; Machida, Y.; Niu, S.; Ikeda, T.; Jana, N.R.; Doi, H.; Kurosawa, M.; Nekooki, M.; Nukina, N. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 148–154, doi:10.1038/nm985. 697
698
 9. Naqvi, S.; Panghal, A.; Flora, S.J.S. Nanotechnology: A Promising Approach for Delivery of Neuroprotective Drugs. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 1–26, doi:10.3389/fnins.2020.00494. 699
700
 10. Teleanu, D.M.; Negut, I.; Grumezescu, V.; Grumezescu, A.M.; Teleanu, R.I. Nanomaterials for drug delivery to the central nervous system. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1–18, doi:10.3390/nano9030371. 701
702
 11. Cunha, A.; Gaubert, A.; Latxague, L.; Dehay, B. PLGA-Based Nanoparticles for Neuroprotective Drug Delivery in Neurodegenerative Diseases. *Pharm. 2021, Vol. 13, Page 1042* **2021**, *13*, 1042, doi:10.3390/PHARMACEUTICS13071042. 703
704
 12. Essa, D.; Kondiah, P.P.D.; Choonara, Y.E.; Pillay, V. The Design of Poly(lactide-co-glycolide) Nanocarriers for Medical Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 1–20, doi:10.3389/fbioe.2020.00048. 705
706
 13. He, H.; Yao, J.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Wang, K.; Lee, R.J.; Yu, B.; Zhang, X. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system to across the blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *519*, 385–390, doi:10.1016/J.BBRC.2019.09.017. 707
708
 14. Benizri, S.; Ferey, L.; Alies, B.; Mebarek, N.; Vacher, G.; Appavoo, A.; Staedel, C.; Gaudin, K.; Barthélémy, P. Nucleoside-Lipid-Based Nanocarriers for Sorafenib Delivery. *Nanoscale Res. Lett.* **2018**, *13*, doi:10.1186/S11671-017-2420-2. 709
710
 15. Makadia, H.K.; Siegel, S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)*. **2011**, *3*, 1377–1397, doi:10.3390/polym3031377. 711
712
 16. Bourdenx, M.; Daniel, J.; Genin, E.; Soria, F.N.; Blanchard-Desce, M.; Bezdard, E.; Dehay, B. Nanoparticles restore lysosomal acidification defects: Implications for Parkinson and other lysosomal-related diseases. *Autophagy* **2016**, *12*, 472–483, doi:10.1080/15548627.2015.1136769. 713
715
 17. Zeng, J.; Martin, A.; Han, X.; Shirihai, O.S.; Grinstaff, M.W. Biodegradable plga nanoparticles restore lysosomal acidity and protect neural pc-12 cells against mitochondrial toxicity. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2019**, *58*, 13910–13917, doi:10.1021/acs.iecr.9b02003. 716
718
 18. Prévot, G.; Soria, F.N.; Thiolat, M.L.; Daniel, J.; Verlhac, J.B.; Blanchard-Desce, M.; Bezdard, E.; Barthélémy, P.; Crauste-Manciet, S.; Dehay, B. Harnessing Lysosomal pH through PLGA Nanoemulsion as a Treatment of Lysosomal-Related Neurodegenerative Diseases. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 4083–4089, doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00697. 719
720
 19. Simeone, L.; Milano, D.; De Napoli, L.; Irace, C.; Di Pascale, A.; Boccalon, M.; Tecilla, P.; Montesarchio, D. Design, Synthesis and Characterisation of Guanosine-Based Amphiphiles. *Chem. – A Eur. J.* **2011**, *17*, 13854–13865, doi:10.1002/CHEM.201101827. 722
724
 20. Hynie, S.; Smrt, J. Effects of adenosine 5'-phosphate esters with lipid hydroxy compounds (adenosine nucleolipids) on the 725

- activity of enzymes of cyclic AMP system. *FEBS Lett.* **1978**, *94*, 339–341, doi:10.1016/0014-5793(78)80971-5. 726
21. Van Tiel, F.H.; Boere, W.A.M.; Harmsen, T.; Kraaijeveld, C.A.; Snippe, H. Determination of inhibitory concentrations of 727
antiviral agents in cell culture by use of an enzyme immunoassay with virus-specific, peroxidase-labeled monoclonal 728
antibodies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 802–805, doi:10.1128/AAC.27.5.802. 729
22. Chabaud, P.; Camplo, M.; Payet, D.; Serin, G.; Moreau, L.; Barthélémy, P.; Grinstaff, M.W. Cationic nucleoside lipids for gene 730
delivery. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 466–472, doi:10.1021/bc050162q. 731
23. Scheidt, H.A.; Flasche, W.; Cismas, C.; Rost, M.; Herrmann, A.; Liebscher, J.; Huster, D. Design and application of lipophilic 732
nucleosides as building blocks to obtain highly functional biological surfaces. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 16279–16287, 733
doi:10.1021/JP046606H. 734
24. Allain, V.; Bourgaux, C.; Couvreur, P. Self-assembled nucleolipids: from supramolecular structure to soft nucleic acid and 735
drug delivery devices. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1891, doi:10.1093/NAR/GKR681. 736
25. Swastika; Chaturvedi, S.; Kaul, A.; Hazari, P.P.; Jha, P.; Pal, S.; Lal, S.; Singh, B.; Barthélémy, P.; Mishra, A.K. Evaluation of 737
BBB permeable nucleolipid (NLDPU): A di-C15-ketalised palmitone appended uridine as neuro-tracer for SPECT. *Int. J.* 738
Pharm. **2019**, *565*, 269–282, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.04.074. 739
26. Colombo, E.; Biocotino, M.; Frapporti, G.; Randazzo, P.; Christodoulou, M.S.; Piccoli, G.; Polito, L.; Seneci, P.; Passarella, D. 740
Nanolipid-Trehalose Conjugates and Nano-Assemblies as Putative Autophagy Inducers. *Pharm. 2019, Vol. 11, Page 422* **2019**, 741
11, 422, doi:10.3390/PHARMACEUTICS11080422. 742
27. Mandal, S.; Debnath, K.; Jana, N.R.; Jana, N.R. Trehalose-Functionalized Gold Nanoparticle for Inhibiting Intracellular 743
Protein Aggregation. *Langmuir* **2017**, *33*, 13996–14003, doi:10.1021/ACS.LANGMUIR.7B02202. 744
28. Debnath, K.; Pradhan, N.; Singh, B.K.; Jana, N.R.; Jana, N.R. Poly(trehalose) Nanoparticles Prevent Amyloid Aggregation 745
and Suppress Polyglutamine Aggregation in a Huntington’s Disease Model Mouse. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 24126– 746
24139, doi:10.1021/ACSAMI.7B06510. 747
29. Betancourt, T.; Brown, B.; Brannon-Peppas, L. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: Preparation, 748
characterization and in vitro evaluation. *Nanomedicine* **2007**, *2*, 219–232, doi:10.2217/17435889.2.2.219. 749
30. Evers, M.J.W.; Kulkarni, J.A.; Meel, R. van der; Cullis, P.R.; Vader, P.; Schiffelers, R.M. State-of-the-Art Design and Rapid- 750
Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Small Methods* **2018**, *2*, 1700375, 751
doi:10.1002/SMTD.201700375. 752
31. Rowan, A.S.; Nicely, N.I.; Cochrane, N.; Wlassoff, W.A.; Claiborne, A.; Hamilton, C.J. Nucleoside triphosphate mimicry: A 753
sugar triazolyl nucleoside as an ATP-competitive inhibitor of B. anthracis pantothenate kinase. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 754
4029–4036, doi:10.1039/B909729E. 755
32. K, C.; V, V.; M, O.; C, H. A Molecular Reporter for Monitoring Autophagic Flux in Nervous System In Vivo. *Methods Enzymol.* 756
2017, *588*, 109–131, doi:10.1016/BS.MIE.2016.09.077. 757
33. Furuse, M. Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a002907–a002907, 758
doi:10.1101/cshperspect.a002907. 759
34. Pardridge, W.M. Drug transport across the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, *32*, 1959–1972, 760
doi:10.1038/jcbfm.2012.126. 761
35. Cho, C.F.; Wolfe, J.M.; Fadzen, C.M.; Calligaris, D.; Hornburg, K.; Chiocca, E.A.; Agar, N.Y.R.; Pentelute, B.L.; Lawler, S.E. 762
Blood-brain-barrier spheroids as an in vitro screening platform for brain-penetrating agents. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–14, 763
doi:10.1038/ncomms15623. 764
36. Teleanu, D.M.; Chircov, C.; Grumezescu, A.M.; Teleanu, R.I. Neuronanomedicine: An up-to-date overview. *Pharmaceutics* 765
2019, *11*, 1–23, doi:10.3390/pharmaceutics11030101. 766
767

Supporting Information

Trehalose-based Nucleolipids as efficient nanocarriers for intracellular delivery and autophagy induction activity

Anthony Cunha^{1,2}, Alexandra Gaubert¹, Julien Verget¹, Marie-Laure Thiolat², Philippe Barthélémy¹, Laurent Latxague^{1#†}, Benjamin Dehay^{2*#}

¹ Univ. Bordeaux, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, ARNA, ARN: Régulations Naturelle et Artificielle, ChemBioPharm, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux CEDEX, France

² Univ. Bordeaux, CNRS, IMN, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

L. Latxague and B. Dehay are co-last authors

* Correspondence: benjamin.dehay@u-bordeaux.fr (B.D.)

† Deceased December 13, 2021

IR spectroscopy

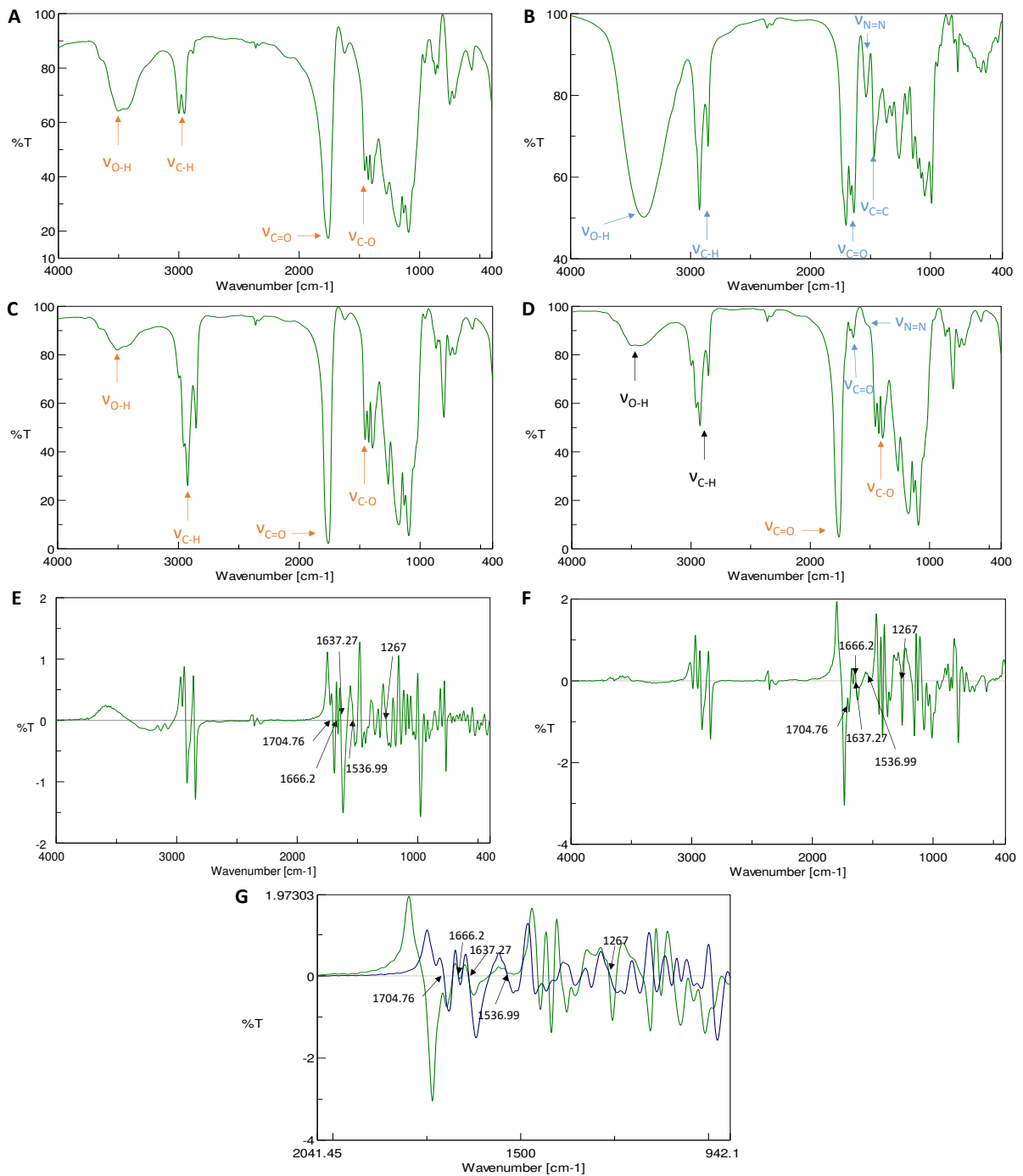


Figure S1. Infrared analysis of PLGA, GNL, and (un)loaded PLGA NPs. IR spectra of (A) PLGA, (B) GNL, (C) F2 and (D) F4, acquired in transmission mode. First derivative of (E) GNL, (F) F4 (Savitzky-Golay: Derivative order 1, Polynomial order 2 and window of 7 points) and (G) zoom of both first derivatives.

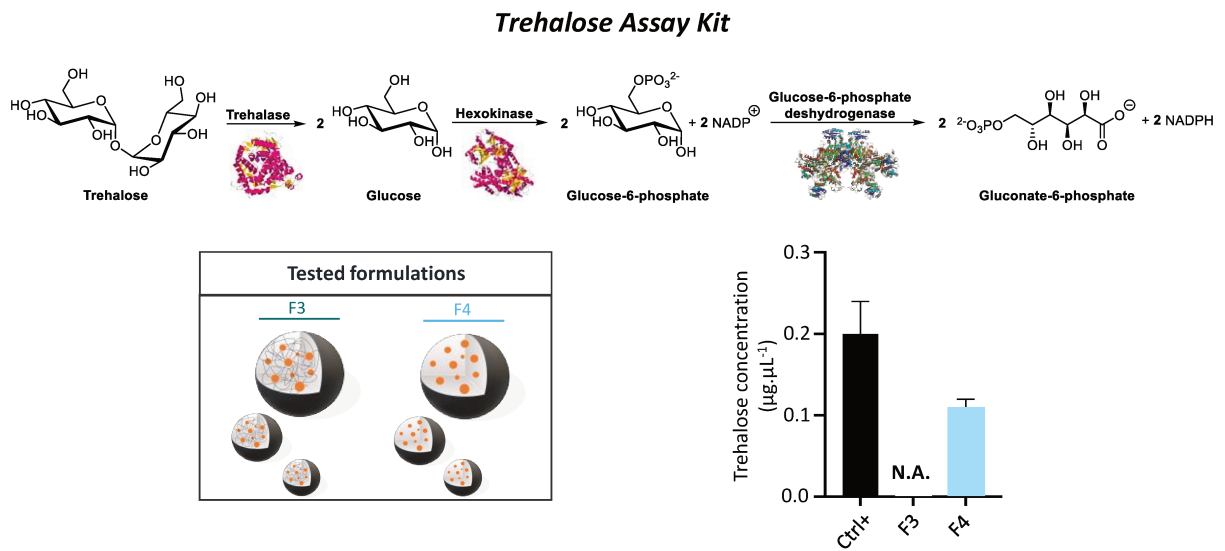


Figure S2. Principle of the enzymatic determination of trehalose. Enzymatic degradation of trehalose allowing the quantification of non-encapsulated GNL by UV spectroscopy.

UV spectroscopy

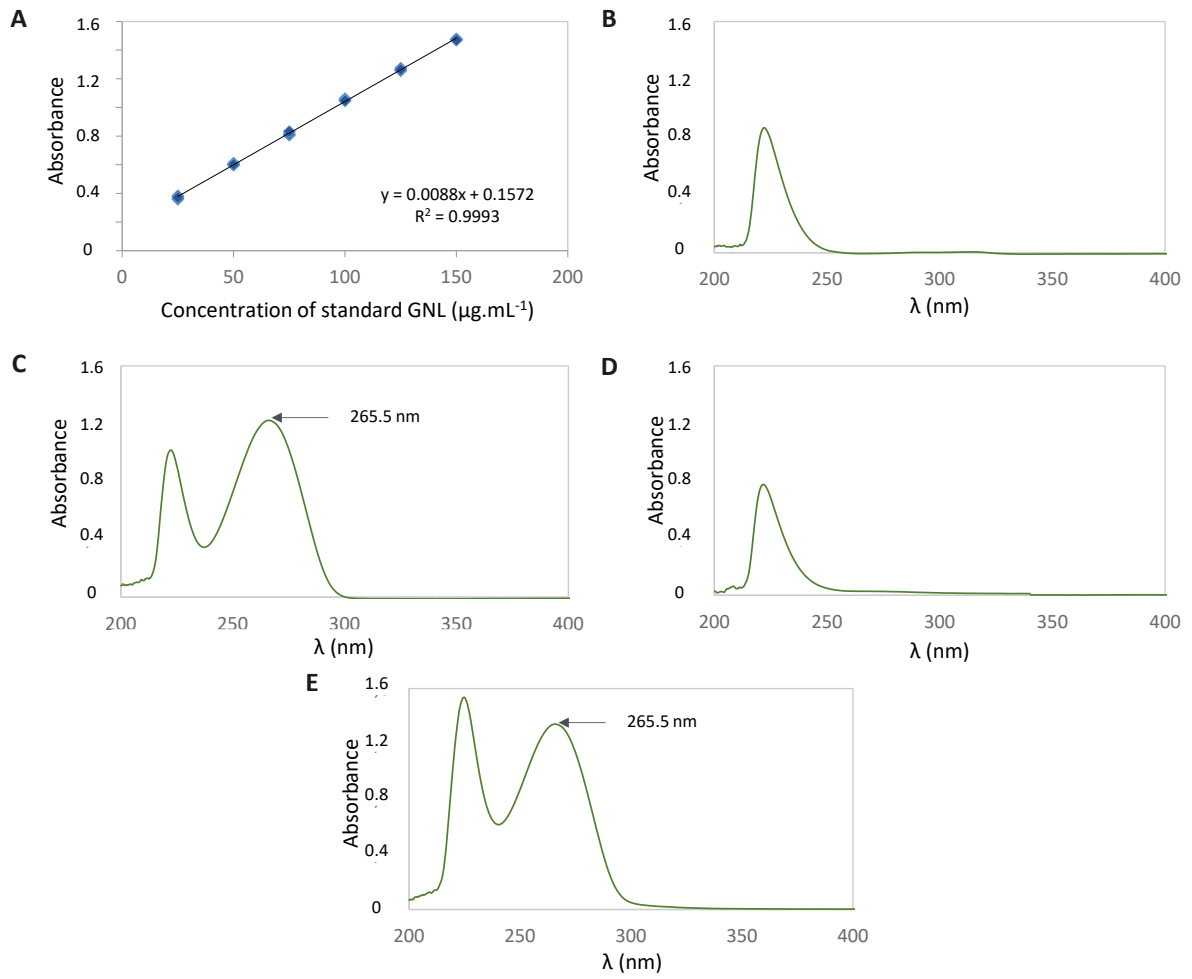


Figure S3. UV spectroscopy assays. (A) Calibration curve of GNL in methanol (concentration: 0.5 to 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; absorbance at 266.5 nm). UV spectra of (B) PLGA, (C) GNL, (D) F2 and (E) F4.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le cerveau est un organe protégé par la présence de cellules endothéliales relativement imperméables (notamment de par les jonctions serrées) constituant la BHE. Cette barrière limite grandement l'administration de substances actives pour le traitement des troubles du SNC. En effet, bien que de nombreuses molécules, aux propriétés biologiques prometteuses, aient déjà montré un potentiel lors d'études *in vitro*, le manque de résultats *in vivo* est généralement dû au fait que ces molécules ne peuvent atteindre le cerveau à une concentration suffisante. Les nanotechnologies conçues pour l'administration de substances actives, telles que les NPs, ont un potentiel considérable pour le traitement des maladies neurodégénératives en particulier. L'objectif principal de l'approche "nanotechnologies" est d'assurer le transport des substances actives jusqu'à leurs sites d'action, grâce à leurs nombreux avantages : stabilité élevée, capacité de transport élevée, incorporation de substances hydrophiles et hydrophobes, grandes variétés de voies d'administration (orale, nasale, ...).

L'objectif de ce travail a été d'élaborer des nano-objets chargés en tréhalose, une substance active aux propriétés neuroprotectrices, à partir de NPs de PLGA ou de nucléolipides stables et modulables. Les caractéristiques physico-chimiques de ces nanoparticules ainsi que leur évaluation biologique pourraient contribuer à augmenter l'efficacité du tréhalose. Ce travail a été réalisé en deux étapes :

Dans un premier temps, les propriétés acides des NPs de PLGA vides ont été étudiées dans le cadre de la restauration du pH lysosomal pour le traitement de la maladie de Parkinson. *In vitro*, la restauration de la fonction lysosomale induite par le traitement aux NPs de PLGA a permis d'augmenter la dégradation de l' α -synucléine par l'activation de l'autophagie lysosomale. *In vivo*, les NPs de PLGA ont également eu un effet neuroprotecteur par la restauration de la fonction lysosomale chez des souris ayant reçu une injection de LBs. De plus, la restauration de l'activité lysosomale par ces NPs a été évaluée à long terme (actif jusqu'à 4 mois après l'injection).

Dans un second temps, des NPs ont été élaborées avec une formulation de glyconucléolipides pour délivrer du tréhalose. Un dérivé de la thymidine couplé à cette substance active a été synthétisé avec succès avant d'être soit encapsulé à l'intérieur de NPs de PLGA, soit formulé sous forme de SLNs (auto-assemblage). La caractérisation physico-chimique de ces nanosystèmes a d'abord mis en évidence leur taille nanométrique ainsi que leur stabilité (au moins 20 jours à 4°C). La TEM a ensuite permis de confirmer la présence de NPs sphériques et la METB de l'auto-assemblage du GNLs sous forme de SLNs. Le taux d'encapsulation et l'efficacité d'encapsulation ont également été analysés confirmant au passage la bonne encapsulation du GNL à l'intérieur des NPs de PLGA. Enfin, des tests *in vitro*

sur des neuroblastomes humains attestent de leur bio-compabilité, leur internalisation au sein des cellules et de leur propriété de renforcement de l'autophagie. Nous avons pu montrer que la modification du tréhalose par l'ajout de NL n'altérerait pas sa fonction biologique. Grâce à ces tests, un mécanisme d'action peut être proposé. La forte internalisation des NPs à base de **GNL** (NPs de PLGA et SLN) augmente la concentration intracellulaire en tréhalose qui, une fois libéré, provoque une activation de l'autophagie.

Par ces travaux de recherche, l'intérêt de concevoir des nanosystèmes à base de nucléolipides, pour l'administration de substances actives et le traitement des maladies neurodégénératives, a été mis en avant.

En perspective, ce travail pourra être complété par plusieurs stratégies. Du point de vue chimique, le développement de nouvelles molécules, en particulier en proposant des modifications sur la tête polaire ou la chaîne lipidique, doit être envisagé. Ces modifications permettront d'étudier plus en détail le rapport entre la structure chimique d'un nucléolipide et la morphologie des objets obtenus par formulation.

D'un point de vue formulation, des tests supplémentaires de caractérisations physico-chimique devront permettre d'étudier la cinétique de libération des NPs de PLGA avant d'évaluer *in vitro* l'effet synergique des propriétés acides du polymères et des propriétés neuroprotectrices du tréhalose.

D'un point de vue biologique, de nouvelles études *in vitro* seront réalisées dans un modèle cellulaire de la maladie de Parkinson (cellules M17 surexprimant l' α -synucléine ou cellules BE(2)-M17 avec déplétion de l'ATPase de type P5 du lysosome (ATP13A2)). Des suivis de l'induction d'autophagie seront également étudiés grâce à l'utilisation d'un plasmide à double protéines fluorescentes (mCherry-GFP-LC3), qui permettra de marquer à la fois les autophagosomes et les autolysosomes. Des essais *in vivo* seront également réalisés pour évaluer les NPs fonctionnalisés chargés en **GNL**, leur capacité à traverser la BHE et à cibler les neurones d'intérêt.

De plus, ces NPs ne seront pas les seuls types de nano-systèmes étudiés pour le transport des **GNL**. En effet, mon travail a permis de lancer un nouveau projet de recherche financé qui consistera à étudier le développement de polymersomes de PLGA fonctionnalisés. Ces nano-vecteurs seront utilisés comme véhicule pour l'administration de substances actives, chargés en **GNLs** convenablement substitués, pour atteindre spécifiquement les neurones dopaminergiques. Les **GNLs** seront conçus comme une plateforme multifonctionnelle composée d'une substance active (le tréhalose) et d'un fluorophore pour un suivi lors des évaluations biologiques. Incorporé à l'intérieur des polymersomes acides, la substance active

sera conduite jusqu'aux neurones dopaminergiques *via* un ciblage spécifique pour traverser la BHE après injection systémique ou intranasale. Une fois dans la *substantia nigra*, un autre ciblage assuré par le **GNL** permettra la pénétration spécifique dans les neurones dopaminergiques pour finalement délivrer l'agent thérapeutique dans le cadre du traitement de la maladie de Parkinson.

RÉFÉRENCES

1. Durães, F.; Pinto, M.; Sousa, E. Old drugs as new treatments for neurodegenerative diseases. *Pharmaceuticals* **2018**, *11*, doi:10.3390/ph11020044.
2. Deuschl, G.; Beghi, E.; Fazekas, F.; Varga, T.; Christoforidi, K.A.; Sipido, E.; Bassetti, C.L.; Vos, T.; Feigin, V.L. The burden of neurological diseases in Europe: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Public Heal.* **2020**, *5*, e551–e567, doi:10.1016/S2468-2667(20)30190-0.
3. Feigin, V.L.; Krishnamurthi, R. V.; Theadom, A.M.; Abajobir, A.A.; Mishra, S.R.; Ahmed, M.B.; Abate, K.H.; Mengistie, M.A.; Wakayo, T.; Abd-Allah, F.; et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol.* **2017**, *16*, 877–897, doi:10.1016/S1474-4422(17)30299-5.
4. Tysnes, O.-B.; Storstein, A. Epidemiology of Parkinson’s disease. *J. Neural Transm.* **2017**, *124*, 901–905, doi:10.1007/s00702-017-1686-y.
5. Liu, S.-Y.; Chan, P.; Stoessl, A.J. The underlying mechanism of prodromal PD: insights from the parasympathetic nervous system and the olfactory system. *Transl. Neurodegener.* **2017**, *6*, 1–9, doi:10.1186/S40035-017-0074-8.
6. Inserm Maladie de Parkinson Available online: <https://www.inserm.fr/dossier/parkinson-maladie/> (accessed on Aug 10, 2021).
7. HAS Guide du parcours de soins, Maladie de Parkinson Available online: www.has-sante.fr (accessed on Aug 10, 2021).
8. Fénelon, G.; Salhi, H. Mild cognitive impairment and Parkinson’s disease. *NPG Neurol. - Psychiatr. - Geriatr.* **2018**, *18*, 355–359, doi:10.1016/J.NPG.2018.08.003.
9. Walsh, R.A.; Lynch, T.; Fahn, S. Parkinson’s Disease. *Neurodegener. Disord.* **2011**, 77–114, doi:10.1007/978-1-84996-011-3_5.
10. Ball, N.; Teo, W.-P.; Chandra, S.; Chapman, J. Parkinson’s Disease and the Environment. *Front. Neurol.* **2019**, *10*, 218, doi:10.3389/FNEUR.2019.00218.
11. Bronstein, J.; Carvey, P.; Chen, H.; Cory-Slechta, D.; DiMonte, D.; Duda, J.; English, P.; Goldman, S.; Grate, S.; Hansen, J.; et al. Meeting Report: Consensus Statement—Parkinson’s Disease and the Environment: Collaborative on Health and the Environment and Parkinson’s Action Network (CHE PAN) Conference 26–28 June 2007. *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117*, 117, doi:10.1289/EHP.11702.
12. Kab, S.; Moisan, F.; Elbaz, A. Farming and incidence of motor neuron disease: French nationwide study. *Eur. J. Neurol.* **2017**, *24*, 1191–1195, doi:10.1111/ene.13353.
13. Kab, S.; Spinosi, J.; Chaperon, L.; Dugravot, A.; Singh-Manoux, A.; Moisan, F.; Elbaz, A. Agricultural activities and the incidence of Parkinson’s disease in the general French population. *Eur. J. Epidemiol.* **2017**, *32*, 203–216, doi:10.1007/s10654-017-0229-z.
14. Janelle, D.-O.; Francesca, C. Pesticides and Parkinson’s Disease. *Pestic. - Impacts Pestic. Expo.* **2011**, doi:10.5772/14108.
15. Tanner, C.M.; Kamel, F.; Ross, G.W.; Hoppin, J.A.; Goldman, S.M.; Korell, M.; Marras, C.; Bhudhikanok, G.S.; Kasten, M.; Chade, A.R.; et al. Rotenone, Paraquat, and Parkinson’s Disease. *Environ. Health Perspect.* **2011**, *119*, 866, doi:10.1289/EHP.1002839.

16. William Langston, J.; Ballard, P.; Tetrud, J.W.; Irwin, I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science (80-.)*. **1983**, *219*, 979–980, doi:10.1126/science.6823561.
17. Davis, G.C.; Williams, A.C.; Markey, S.P.; Ebert, M.H.; Caine, E.D.; Reichert, C.M.; Kopin, I.J. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* **1979**, *1*, 249–254, doi:10.1016/0165-1781(79)90006-4.
18. Kalia, L. V.; Lang, A.E. Parkinson's disease. *Lancet* **2015**, *386*, 896–912, doi:10.1016/S0140-6736(14)61393-3.
19. Lin, M.K.; Farrer, M.J. Genetics and genomics of Parkinson's disease. *Genome Med.* **2014**, *6*, doi:10.1186/gm566.
20. Defebvre, L. Parkinson's disease: Role of genetic and environment factors. Involvement in everyday clinical practice. *Rev. Neurol. (Paris)*. **2010**, *166*, 764–769, doi:10.1016/J.NEUROL.2010.07.014.
21. Marder, K.; Tang, M.X.; Mejia, H.; Alfaro, B.; Côté, L.; Louis, E.; Groves, J.; Mayeux, R. Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community- based study. *Neurology* **1996**, *47*, 155–160, doi:10.1212/WNL.47.1.155.
22. Jankovic, J.; Aguilar, L.G. Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2008**, *4*, 743, doi:10.2147/NDT.S2006.
23. Ars, M. Outil d'information sur la prise en charge orthophonique dans la maladie de Parkinson pertinence et élaboration. **2011**, 1–145.
24. Ransmayr, G. Physical, occupational, speech and swallowing therapies and physical exercise in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **2011**, *118*, 773–781, doi:10.1007/s00702-011-0622-9.
25. Lancelot, M. Enjeux philosophiques d'un soin technologique. **2019**, 1–424.
26. Neurology Today Available online: <https://journals.lww.com/neurotodayonline/blog/breakingnews/pages/post.aspx?PostID=476> (accessed on Aug 11, 2021).
27. Xie, C.-L.; Shao, B.; Chen, J.; Zhou, Y.; Lin, S.-Y.; Wang, W.-W. Effects of neurostimulation for advanced Parkinson's disease patients on motor symptoms: A multiple-treatments meta-analysas of randomized controlled trials. *Sci. Reports 2016 61* **2016**, *6*, 1–11, doi:10.1038/srep25285.
28. Carbone, F.; Djamshidian, A.; Seppi, K.; Poewe, W. Apomorphine for Parkinson's Disease: Efficacy and Safety of Current and New Formulations. *CNS Drugs* **2019**, *33*, 905–918, doi:10.1007/s40263-019-00661-z.
29. Nyholm, D. Duodopa® treatment for advanced Parkinson's disease: A review of efficacy and safety. *Park. Relat. Disord.* **2012**, *18*, 916–929, doi:10.1016/j.parkreldis.2012.06.022.
30. Le traitement médicamenteux de la maladie de Parkinson - VIDAL Available online: <https://www.vidal.fr/maladies/systeme-nerveux/maladie-parkinson/traitement.html> (accessed on Aug 11, 2021).
31. Katzenschlager, R.; Lees, A.J. Treatment of Parkinson's disease: Levodopa as the first choice. *J. Neurol. Suppl.* **2002**, *249*, doi:10.1007/s00415-002-1204-4.

32. Hauser, R.A. Levodopa: Past, Present, and Future. *Eur Neurol* **2009**, *62*, 1–8, doi:10.1159/000215875.
33. Gordin, A.; Brooks, D.J. Clinical pharmacology and therapeutic use of COMT inhibition in Parkinson's disease. *J. Neurol.* *2007* *2544* **2007**, *254*, IV37–IV48, doi:10.1007/S00415-007-4007-9.
34. Thanvi, B.; Lo, T. Long term motor complications of levodopa: clinical features, mechanisms, and management strategies. *Postgrad. Med. J.* **2004**, *80*, 452, doi:10.1136/PGMJ.2003.013912.
35. Noordhout, A.M. de Traitement de la maladie de Parkinson en 2009. *Rev Med Suisse* **2009**, *5*, 1650–1655.
36. Lee, H.J.; Yoon, Y.S.; Lee, S.J. Mechanism of neuroprotection by trehalose: Controversy surrounding autophagy induction. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, doi:10.1038/s41419-018-0749-9.
37. Khalifeh, M.; Barreto, G.E.; Sahebkar, A. Trehalose as a promising therapeutic candidate for the treatment of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 1173–1189, doi:10.1111/bph.14623.
38. Schneider, G.; Käck, H.; Lindqvist, Y. The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. *Structure* **2000**, *8*, doi:10.1016/S0969-2126(00)00085-X.
39. Goedert, M. The awakening of α -synuclein. *Nat.* *1997* *3886639* **1997**, *388*, 232–233, doi:10.1038/40767.
40. Schwartz, A.B.; Cui, X.T.; Weber, D.J.J.; Moran, D.W. Brain-Controlled Interfaces: Movement Restoration with Neural Prosthetics. *Neuron* **2006**, *52*, 205–220, doi:10.1016/j.neuron.2006.09.019.
41. Lee, V.M.Y.; Trojanowski, J.Q. Mechanisms of Parkinson's Disease Linked to Pathological α -Synuclein: New Targets for Drug Discovery. *Neuron* **2006**, *52*, 33–38, doi:10.1016/j.neuron.2006.09.026.
42. Holdorff, B. Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work. *J. Hist. Neurosci.* **2002**, *11*, 19–28, doi:10.1076/jhin.11.1.19.9106.
43. Corti, O.; Lesage, S.; Brice, A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 1161–1218, doi:10.1152/physrev.00022.2010.
44. Polymeropoulos, M.H.; Lavedan, C.; Leroy, E.; Ide, S.E.; Dehejia, A.; Dutra, A.; Pike, B.; Root, H.; Rubenstein, J.; Boyer, R.; et al. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (80-.).* **1997**, *276*, 2045–2047, doi:10.1126/science.276.5321.2045.
45. Spillantini, M.G.; Schmidt, M.L.; Lee, V.M.Y.; Trojanowski, J.Q.; Jakes, R.; Goedert, M. α -synuclein in Lewy bodies [8]. *Nature* **1997**, *388*, 839–840, doi:10.1038/42166.
46. Coquel, A.-S. Dynamique de l'agrégation protéique chez la bactérie *Escherichia coli*. **2012**.
47. Alexander, G.E. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2004**, *6*, 259, doi:10.31887/DCNS.2004.6.3/GALEXANDER.

48. Maiti, P.; Manna, J.; Dunbar, G.L.; Maiti, P.; Dunbar, G.L. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Transl. Neurodegener.* **2017**, *6*, doi:10.1186/s40035-017-0099-z.
49. Wang, Z.; Gao, G.; Duan, C.; Yang, H. Progress of immunotherapy of anti- α -synuclein in Parkinson's disease. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *115*, doi:10.1016/j.biopha.2019.108843.
50. Ballabio, A.; Bonifacino, J.S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *21*, 101–118, doi:10.1038/s41580-019-0185-4.
51. Dehay, B.; Bové, J.; Rodríguez-Muela, N.; Perier, C.; Recasens, A.; Boya, P.; Vila, M. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 12535–12544, doi:10.1523/JNEUROSCI.1920-10.2010.
52. Crews, L.; Spencer, B.; Desplats, P.; Patrick, C.; Paulino, A.; Rockenstein, E.; Hansen, L.; Adame, A.; Galasko, D.; Masliah, E. Selective Molecular Alterations in the Autophagy Pathway in Patients with Lewy Body Disease and in Models of α -Synucleinopathy. *PLoS One* **2010**, *5*, e9313, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0009313.
53. Chu, Y.; Dodiya, H.; Aebischer, P.; Olanow, C.W.; Kordower, J.H. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: Relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *35*, 385–398, doi:10.1016/j.nbd.2009.05.023.
54. Harnett, M.M.; Pineda, M.A.; Latré de Laté, P.; Eason, R.J.; Besteiro, S.; Harnett, W.; Langsley, G. From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home. *Biomed. J.* **2017**, *40*, 9–22, doi:10.1016/j.bj.2016.12.004.
55. Khandia, R.; Dadar, M.; Munjal, A.; Dhama, K.; Karthik, K.; Tiwari, R.; Yattoo, M.I.; Iqbal, H.M.N.; Singh, K.P.; Joshi, S.K.; et al. A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy. *Cells* **2019**, *8*, 674, doi:10.3390/CELLS8070674.
56. Pietrocola, F. Regulation of Autophagy by Acetyl Coenzyme A : From the Mechanisms to a Revised Definition of Caloric Restriction Mimetics. **2015**.
57. Puyal, J.; Ginet, V.; Vaslin, A.; Truttmann, A.C.; Clarke, P.G.H. Les deux visages de l'autophagie dans le système nerveux. *Medecine/Sciences* **2009**, *25*, 383–390, doi:10.1051/medsci/2009254383.
58. Khalifeh, M.; Barreto, G.E.; Sahebkar, A. Trehalose as a promising therapeutic candidate for the treatment of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 1173–1189, doi:10.1111/bph.14623.
59. Maire, I. Le système lysosomal dans la protéolyse : panorama des maladies lysosomiales. *Bull. Acad. Natl. Med.* **2012**, *196*, 1561–1574, doi:10.1016/s0001-4079(19)31682-6.
60. Pan, T.; Kondo, S.; Le, W.; Jankovic, J. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain* **2008**, *131*, 1969–1978, doi:10.1093/brain/awm318.
61. Bourdenx, M.; Dehay, B. Autophagie et cerveau. *Medecine/Sciences* **2017**, *33*, 268–274,

doi:10.1051/medsci/20173303013.

62. Ho, M.; Patel, A.; Hanley, C.; Murphy, A.; McSweeney, T.; Zhang, L.; McCann, A.; O’Gorman, P.; Bianchi, G. Exploiting autophagy in multiple myeloma. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2019**, *5*, doi:10.20517/2394-4722.2019.25.
63. Cuervo, A.M.; Wong, E. Chaperone-mediated autophagy: Roles in disease and aging. *Cell Res.* **2014**, *24*, 92–104, doi:10.1038/cr.2013.153.
64. Xilouri, M.; Brekk, O.R.; Stefanis, L. Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson’s Disease and Related Synucleopathies. *Mov. Disord.* **2016**, *31*, 178–192, doi:10.1002/mds.26477.
65. Suzuki, K.; Kubota, Y.; Sekito, T.; Ohsumi, Y. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes to Cells* **2007**, *12*, 209–218, doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01050.x.
66. Pattingre, S.; Espert, L.; Biard-Piechaczyk, M.; Codogno, P. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* **2008**, *90*, 313–323, doi:10.1016/j.biochi.2007.08.014.
67. Dehay, B.; Martinez-Vicente, M.; Caldwell, G.A.; Caldwell, K.A.; Yue, Z.; Cookson, M.R.; Klein, C.; Vila, M.; Bezdard, E. Lysosomal impairment in Parkinson’s disease. *Mov. Disord.* **2013**, *28*, 725–732, doi:10.1002/mds.25462.
68. Richards, A.B.; Krakowka, S.; Dexter, L.B.; Schmid, H.; Wolterbeek, A.P.M.; Waalkens-Berendsen, D.H.; Shigoyuki, A.; Kurimoto, M. Trehalose: A review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 871–898, doi:10.1016/S0278-6915(02)00011-X.
69. Argüelles, J.-C. Why Can’t Vertebrates Synthesize Trehalose? *J. Mol. Evol.* **2014**, *79*, 111–116, doi:10.1007/S00239-014-9645-9.
70. Chen, Q.; Haddad, G.G. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: From flies to mammals. *J. Exp. Biol.* **2004**, *207*, 3125–3129, doi:10.1242/jeb.01133.
71. Halbe, L.; Rami, A. Trehalase localization in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of mouse brains. *J. Adv. Res.* **2019**, *18*, 71–79, doi:10.1016/j.jare.2019.01.009.
72. Magazu, S.; Migliardo, F. Molecular Mechanisms of Bioprotection Process by Trehalose. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2010**, *6*, 157–160, doi:10.2174/157340110792389181.
73. Hernandez, E.; Taisne, C.; Lussignol, M.; Esclatine, A.; Labetoulle, M. Commercially Available Eye Drops Containing Trehalose Protect against Dry Conditions via Autophagy Induction. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2021**, *37*, 386–393, doi:10.1089/jop.2020.0119.
74. Sharma, V.; Makhdoomi, M.; Singh, L.; Kumar, P.; Khan, N.; Singh, S.; Verma, H.N.; Luthra, K.; Sarkar, S.; Kumar, D. Trehalose limits opportunistic mycobacterial survival during HIV co-infection by reversing HIV-mediated autophagy block. *Autophagy* **2021**, *17*, 476–495, doi:10.1080/15548627.2020.1725374.
75. Martinon, D.; Borges, V.F.; Gomez, A.C.; Shimada, K. Potential Fast COVID-19 Containment With Trehalose. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1623,

doi:10.3389/FIMMU.2020.01623.

76. Tanaka, M.; Machida, Y.; Niu, S.; Ikeda, T.; Jana, N.R.; Doi, H.; Kurosawa, M.; Nekooki, M.; Nukina, N. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 148–154, doi:10.1038/nm985.
77. Khalifeh, M.; Read, M.I.; Barreto, G.E.; Sahebkar, A. Trehalose against Alzheimer's Disease: Insights into a Potential Therapy. *BioEssays* **2020**, *42*, doi:10.1002/bies.201900195.
78. Khalifeh, M.; Barreto, G.E.; Sahebkar, A. Trehalose as a promising therapeutic candidate for the treatment of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 1173–1189, doi:10.1111/bph.14623.
79. Rusmini, P.; Cortese, K.; Crippa, V.; Cristofani, R.; Cicardi, M.E.; Ferrari, V.; Vezzoli, G.; Tedesco, B.; Meroni, M.; Messi, E.; et al. Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1535292> **2018**, *15*, 631–651, doi:10.1080/15548627.2018.1535292.
80. Ajito, S.; Hirai, M.; Iwase, H.; Shimizu, N.; Igarashi, N.; Ohta, N.; Ajito, S.; Hirai, M.; Iwase, H.; Shimizu, N.; et al. Protective action of trehalose and glucose on protein hydration shell clarified by using X-ray and neutron scattering. *PhyB* **2018**, *551*, 249–255, doi:10.1016/J.PHYSB.2018.03.040.
81. Mayer, A.L.; Higgins, C.B.; Heitmeier, M.R.; Kraft, T.E.; Qian, X.; Crowley, J.R.; Hyrc, K.L.; Beatty, W.L.; Yarasheski, K.E.; Hruz, P.W.; et al. SLC2A8 (GLUT8) is a mammalian trehalose transporter required for trehalose-induced autophagy. *Sci. Reports* **2016**, *6*, 1–15, doi:10.1038/srep38586.
82. Uchida, K.; Unuma, K.; Funakoshi, T.; Aki, T.; Uemura, K. Activation of Master Autophagy Regulator TFEB During Systemic LPS Administration in the Cornea. *J. Toxicol. Pathol.* **2014**, *27*, 153, doi:10.1293/TOX.2014-0004.
83. DeBosch, B.J.; Heitmeier, M.R.; Mayer, A.L.; Higgins, C.B.; Crowley, J.R.; Kraft, T.E.; Chi, M.; Newberry, E.P.; Chen, Z.; Finck, B.N.; et al. Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Sci. Signal.* **2016**, *9*, doi:10.1126/scisignal.aac5472.
84. Zhu, L.; Yuan, Y.; Yuan, L.; Li, L.; Liu, F.; Liu, J.; Chen, Y.; Lu, Y.; Cheng, J. Activation of TFEB-mediated autophagy by trehalose attenuates mitochondrial dysfunction in cisplatin-induced acute kidney injury. *Theranostics* **2020**, *10*, 5829–5844, doi:10.7150/THNO.44051.
85. Liu, R.; Barkhordarian, H.; Emadi, S.; Chan, B.P.; Sierks, M.R. Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 74–81, doi:10.1016/j.nbd.2005.02.003.
86. Sarkar, S.; Davies, J.E.; Huang, Z.; Tunnacliffe, A.; Rubinsztein, D.C. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 5641–5652, doi:10.1074/jbc.M609532200.
87. Yu, W.B.; Jiang, T.; Lan, D.M.; Lu, J.H.; Yue, Z.Y.; Wang, J.; Zhou, P. Trehalose inhibits fibrillation of A53T mutant alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *523*, 144–150, doi:10.1016/j.abb.2012.04.021.

88. Zhao, J.; Zhi, X.; Pan, L.; Zhou, P. Trehalose inhibits A53T Mutant α -Synuclein overexpression and neurotoxicity in transduced PC12 Cells. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22081293.
89. Debnath, K.; Pradhan, N.; Singh, B.K.; Jana, N.R.; Jana, N.R. Poly(trehalose) Nanoparticles Prevent Amyloid Aggregation and Suppress Polyglutamine Aggregation in a Huntington's Disease Model Mouse. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 24126–24139, doi:10.1021/ACSAMI.7B06510.
90. Mandal, S.; Debnath, K.; Jana, N.R.; Jana, N.R. Trehalose-Functionalized Gold Nanoparticle for Inhibiting Intracellular Protein Aggregation. *Langmuir* **2017**, *33*, 13996–14003, doi:10.1021/ACS.LANGMUIR.7B02202.
91. Colombo, E.; Biocotino, M.; Frapporti, G.; Randazzo, P.; Christodoulou, M.S.; Piccoli, G.; Polito, L.; Seneci, P.; Passarella, D. Nanolipid-Trehalose Conjugates and Nano-Assemblies as Putative Autophagy Inducers. *Pharm. 2019, Vol. 11, Page 422* **2019**, *11*, 422, doi:10.3390/PHARMACEUTICS11080422.
92. Fernandez-Estevez, M.A.; Casarejos, M.J.; Sendon, J.L.; Caldentey, J.G.; Ruiz, C.; Gomez, A.; Perucho, J.; Yébenes, J.G. de; Mena, M.A. Trehalose Reverses Cell Malfunction in Fibroblasts from Normal and Huntington's Disease Patients Caused by Proteasome Inhibition. *PLoS One* **2014**, *9*, e90202, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0090202.
93. Zhang, J.; Dai, W.; Geng, P.; Zhang, L.; Tan, Q.; Cheng, D.; Wei, P.; Yang, Z.; Zhang, L.; Gu, E.; et al. Midazolam Enhances Mutant Huntingtin Protein Accumulation via Impairment of Autophagic Degradation In Vitro. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *48*, 683–691, doi:10.1159/000491895.
94. García-Viñuales, S.; Ahmed, R.; Sciacca, M.F.M.; Lanza, V.; Giuffrida, M.L.; Zimbone, S.; Romanucci, V.; Zarrelli, A.; Bongiorno, C.; Spinella, N.; et al. Trehalose Conjugates of silybin as prodrugs for targeting toxic A β aggregates. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11*, 2566–2576, doi:10.1021/ACSCHEMNEURO.0C00232.
95. Benito-Cuesta, I.; Ordoñez-Gutierrez, L.; Wandosell, F. Trehalose Reduces the Secreted Beta-Amyloid Levels in Primary Neurons Independently of Autophagy Induction. *Metab. 2021, Vol. 11, Page 421* **2021**, *11*, 421, doi:10.3390/METABO11070421.
96. Lan, D.-M.; Liu, F.-T.; Zhao, J.; Chen, Y.; Wu, J.-J.; Ding, Z.-T.; Yue, Z.-Y.; Ren, H.-M.; Jiang, Y.-P.; Wang, J. Effect of Trehalose on PC12 Cells Overexpressing Wild-Type or A53T Mutant α -synuclein. *Neurochem. Res.* **2012**, *37*, 2025–2032, doi:10.1007/S11064-012-0823-0.
97. Casarejos, M.J.; Solano, R.M.; Gómez, A.; Perucho, J.; De Yébenes, J.G.; Mena, M.A. The accumulation of neurotoxic proteins, induced by proteasome inhibition, is reverted by trehalose, an enhancer of autophagy, in human neuroblastoma cells. *Neurochem. Int.* **2011**, *58*, 512–520, doi:10.1016/j.neuint.2011.01.008.
98. Schaeffer, V.; Lavenir, I.; Ozcelik, S.; Tolnay, M.; Winkler, D.T.; Goedert, M. Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. *Brain* **2012**, *135*, 2169, doi:10.1093/BRAIN/AWS143.
99. Portbury, S.D.; Hare, D.J.; Sgambelloni, C.; Perronnes, K.; Portbury, A.J.; Finkelstein, D.I.; Adlard, P.A. Trehalose Improves Cognition in the Transgenic Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *60*, 549–560,

doi:10.3233/JAD-170322.

100. Howson, P.A.; Johnston, T.H.; Ravenscroft, P.; Hill, M.P.; Su, J.; Brotchie, J.M.; Koprach, J.B. Beneficial effects of trehalose on striatal dopaminergic deficits in rodent and primate models of synucleinopathy in Parkinson's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2019**, *369*, 364–374, doi:10.1124/jpet.118.255695.
101. He, Q.; Koprach, J.B.; Wang, Y.; Yu, W. bo; Xiao, B. guo; Brotchie, J.M.; Wang, J. Treatment with Trehalose Prevents Behavioral and Neurochemical Deficits Produced in an AAV α -Synuclein Rat Model of Parkinson's Disease. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 2258–2268, doi:10.1007/s12035-015-9173-7.
102. Gawdi, R.; Emmady, P.D. Physiology, Blood Brain Barrier. *StatPearls* **2020**.
103. Ribatti, D.; Nico, B.; Crivellato, E.; Artico, M. Development of the blood-brain barrier: A historical point of view. *Anat. Rec. Part B New Anat.* **2006**, *289B*, 3–8, doi:10.1002/AR.B.20087.
104. Cano, A.; Sánchez-López, E.; Ettcheto, M.; López-Machado, A.; Espina, M.; Souto, E.B.; Galindo, R.; Camins, A.; García, M.L.; Turowski, P. Current advances in the development of novel polymeric nanoparticles for the treatment of neurodegenerative diseases. *Nanomedicine* **2020**, *15*, 1239–1261, doi:10.2217/nnm-2019-0443.
105. Daneman, R.; Prat, A. The blood–brain barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7*, doi:10.1101/cshperspect.a020412.
106. Bors, L.A.; Erdő, F. Overcoming the Blood–Brain Barrier. Challenges and Tricks for CNS Drug Delivery. *Sci. Pharm.* *2019*, *Vol. 87*, *Page 6* **2019**, *87*, *6*, doi:10.3390/SCIPHARM87010006.
107. Bellettato, C.M.; Scarpa, M. Possible strategies to cross the blood–brain barrier. *Ital. J. Pediatr.* *2018 442* **2018**, *44*, 127–133, doi:10.1186/S13052-018-0563-0.
108. Pandit, R.; Chen, L.; Götz, J. The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *165–166*, 1–14, doi:10.1016/J.ADDR.2019.11.009.
109. Bonferoni, M.C.; Rossi, S.; Sandri, G.; Ferrari, F.; Gavini, E.; Rassu, G.; Giunchedi, P. Nanoemulsions for “Nose-to-Brain” Drug Delivery. *Pharm.* *2019*, *Vol. 11*, *Page 84* **2019**, *11*, *84*, doi:10.3390/PHARMACEUTICS11020084.
110. Teleanu, D.M.; Chircov, C.; Grumezescu, A.M.; Volceanov, A.; Teleanu, R.I. Blood-Brain Delivery Methods Using Nanotechnology. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, doi:10.3390/PHARMACEUTICS10040269.
111. Patra, J.K.; Das, G.; Fraceto, L.F.; Campos, E.V.R.; Rodriguez-Torres, M. del P.; Acosta-Torres, L.S.; Diaz-Torres, L.A.; Grillo, R.; Swamy, M.K.; Sharma, S.; et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology 2018 161* **2018**, *16*, 1–33, doi:10.1186/S12951-018-0392-8.
112. McClements, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* **2012**, *8*, 1719–1729, doi:10.1039/C2SM06903B.
113. Gupta, A.; Eral, H.B.; Hatton, T.A.; Doyle, P.S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter* **2016**, *12*, 2826–2841, doi:10.1039/C5SM02958A.
114. Prevot, G. Plateforme de nanoémulsions destinées au diagnostic et à la thérapeutique.

2018.

115. Mason, T.G.; Wilking, J.N.; Meleson, K.; Chang, C.B.; Graves, S.M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18*, R635, doi:10.1088/0953-8984/18/41/R01.
116. Ashaolu, T.J. Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review. *Environ. Chem. Lett.* **2021**, *19*, 3381–3395, doi:10.1007/S10311-021-01216-9.
117. Wooster, T.J.; Golding, M.; Sanguansri, P. Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability. *Langmuir* **2008**, *24*, 12758–12765, doi:10.1021/LA801685V.
118. Azeem, A.; Rizwan, M.; Ahmad, F.J.; Iqbal, Z.; Khar, R.K.; Aqil, M.; Talegaonkar, S. Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10*, 69, doi:10.1208/S12249-008-9178-X.
119. Mahdi, Z.H.; Maraie, N.K. Overview on nanoemulsion as a recently developed approach in drug nanoformulation. *Res. J. Pharm. Technol.* **2019**, *12*, 5554–5560, doi:10.5958/0974-360X.2019.00963.6.
120. Silva, H.D.; Cerqueira, M.A.; Vicente, A.A. Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. *J. Food Eng.* **2015**, *167*, 89–98, doi:10.1016/J.JFOODENG.2015.07.037.
121. Aulton, M.E.; Taylor, K. Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines. **2013**, 894.
122. K. Gurpreet; S. K. Singh Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques. *Indian J. Pharm. Sci.* **2018**, *80*, doi:10.4172/PHARMACEUTICAL-SCIENCES.1000422.
123. Safaya, M.; Rotliwala, Y.C. Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique. *Mater. Today Proc.* **2020**, *27*, 454–459, doi:10.1016/J.MATPR.2019.11.267.
124. Nirale, P.; Paul, A.; Yadav, K.S. Nanoemulsions for targeting the neurodegenerative diseases: Alzheimer's, Parkinson's and Prion's. *Life Sci.* **2020**, *245*, 117394, doi:10.1016/J.LFS.2020.117394.
125. Bhanushali, R.S.; Gatne, M.M.; Gaikwad, R. V.; Bajaj, A.N.; Morde, M.A. Nanoemulsion based Intranasal Delivery of Antimigraine Drugs for Nose to Brain Targeting. *Indian J. Pharm. Sci.* **2009**, *71*, 707.
126. Chatterjee, B.; Gorain, B.; Mohananaidu, K.; Sengupta, P.; Mandal, U.K.; Choudhury, H. Targeted drug delivery to the brain via intranasal nanoemulsion: Available proof of concept and existing challenges. *Int. J. Pharm.* **2019**, *565*, 258–268, doi:10.1016/J.IJPHARM.2019.05.032.
127. Mustafa, G.; Baboota, S.; Ahuja, A.; Ali, J. Formulation Development of Chitosan Coated Intra Nasal Ropinirole Nanoemulsion for Better Management Option of Parkinson: An In Vitro Ex Vivo Evaluation. *Curr. Nanosci.* **2012**, *8*, 348–360, doi:10.2174/157341312800620331.
128. Pangen, R.; Sharma, S.; Mustafa, G.; Ali, J.; Baboota, S. Vitamin E loaded resveratrol nanoemulsion for brain targeting for the treatment of Parkinson's disease by reducing

- oxidative stress. *Nanotechnology* **2014**, 25, 485102, doi:10.1088/0957-4484/25/48/485102.
129. Potter, G.A.; Patterson, L.H.; Wanogho, E.; Perry, P.J.; Butler, P.C.; Ijaz, T.; Ruparelia, K.C.; Lamb, J.H.; Farmer, P.B.; Stanley, L.A.; et al. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br. J. Cancer* 2002 865 **2002**, 86, 774–778, doi:10.1038/sj.bjc.6600197.
130. Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* **2019**, 12, 908–931, doi:10.1016/J.ARABJC.2017.05.011.
131. De la Fuente, J.M.; Grazu, V. Nanobiotechnology - Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles. *Front. Nanosci.* **2012**, 4, 309–335.
132. Freyand, N.A.; Sun, S. Inorganic Nanoparticles: Synthesis, Applications, and Perspectives (Nanomaterials and their Applications). **2016**, 558.
133. Kim, D.; Kim, J.; Park, Y. Il; Lee, N.; Hyeon, T. Recent Development of Inorganic Nanoparticles for Biomedical Imaging. *ACS Cent. Sci.* **2018**, 4, 324, doi:10.1021/ACSCENTSCI.7B00574.
134. Yang, G.; Phua, S.Z.F.; Bindra, A.K.; Zhao, Y. Degradability and Clearance of Inorganic Nanoparticles for Biomedical Applications. *Adv. Mater.* **2019**, 31, 1805730, doi:10.1002/ADMA.201805730.
135. Mitragotri, S.; Stayton, P. Organic nanoparticles for drug delivery and imaging. *MRS Bull.* **2014**, 39, 219–223, doi:10.1557/MRS.2014.11.
136. Bourdenx, M.; Daniel, J.; Genin, E.; Soria, F.N.; Blanchard-Desce, M.; Bezard, E.; Dehay, B. Nanoparticles restore lysosomal acidification defects: Implications for Parkinson and other lysosomal-related diseases. *Autophagy* **2016**, 12, 472–483, doi:10.1080/15548627.2015.1136769.
137. Tsai, M.J.; Huang, Y. Bin; Wu, P.C.; Fu, Y.S.; Kao, Y.R.; Fang, J.Y.; Tsai, Y.H. Oral Apomorphine Delivery from Solid Lipid Nanoparticles with Different Monostearate Emulsifiers: Pharmacokinetic and Behavioral Evaluations. *J. Pharm. Sci.* **2011**, 100, 547–557, doi:10.1002/JPS.22285.
138. Müller, R.H.; Radtke, M.; Wissing, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, doi:10.1016/S0169-409X(02)00118-7.
139. Pardi, N.; Hogan, M.J.; Porter, F.W.; Weissman, D. mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, 17, 261–279, doi:10.1038/nrd.2017.243.
140. Paliwal, R.; Paliwal, S.R.; Kenwat, R.; Kurmi, B. Das; Sahu, M.K. Solid lipid nanoparticles: a review on recent perspectives and patents. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1720649> **2020**, 30, 179–194, doi:10.1080/13543776.2020.1720649.
141. Kovačević, A.B.; Müller, R.H.; Savić, S.D.; Vuleta, G.M.; Keck, C.M. Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, 444, 15–25, doi:10.1016/J.COLSURFA.2013.12.023.

142. Cacciatore, I.; Ciulla, M.; Fornasari, E.; Marinelli, L.; Stefano, A. Di Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for the treatment of neurodegenerative diseases. <http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2016.1178237> **2016**, *13*, 1121–1131, doi:10.1080/17425247.2016.1178237.
143. Poovaiah, N.; Davoudi, Z.; Peng, H.; Schlichtmann, B.; Mallapragada, S.; Narasimhan, B.; Wang, Q. Treatment of neurodegenerative disorders through the blood–brain barrier using nanocarriers. *Nanoscale* **2018**, *10*, 16962–16983, doi:10.1039/C8NR04073G.
144. D’Souza, A.A. Solid lipid nanoparticles: A modern approach for the treatment of neurodegenerative diseases. *Nanotechnol. Appl. Energy, Drug Food* **2019**, 209–225, doi:10.1007/978-3-319-99602-8_9.
145. Esposito, E.; Fantin, M.; Marti, M.; Drechsler, M.; Paccamiccio, L.; Mariani, P.; Sivieri, E.; Lain, F.; Menegatti, E.; Morari, M.; et al. Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bromocriptine. *Pharm. Res.* **2007**, *257* **2008**, *25*, 1521–1530, doi:10.1007/S11095-007-9514-Y.
146. Gastaldi, L.; Battaglia, L.; Peira, E.; Chirio, D.; Muntoni, E.; Solazzi, I.; Gallarate, M.; Dosio, F. Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: Current state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, *87*, 433–444, doi:10.1016/J.EJPB.2014.05.004.
147. Preusch, P.C. Equilibrative and Concentrative Transport Mechanisms. *Princ. Clin. Pharmacol.* **2007**, 197–227, doi:10.1016/B978-012369417-1/50054-7.
148. Scheidt, H.A.; Flasche, W.; Cismas, C.; Rost, M.; Herrmann, A.; Liebscher, J.; Huster, D. Design and application of lipophilic nucleosides as building blocks to obtain highly functional biological surfaces. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 16279–16287, doi:10.1021/JP046606H.
149. Allain, V.; Bourgaux, C.; Couvreur, P. Self-assembled nucleolipids: From supramolecular structure to soft nucleic acid and drug delivery devices. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1891–1903, doi:10.1093/nar/gkr681.
150. Pradhan, N.; Shekhar, S.; Jana, N.R.; Jana, N.R. Sugar-Terminated Nanoparticle Chaperones Are 102-105 Times Better Than Molecular Sugars in Inhibiting Protein Aggregation and Reducing Amyloidogenic Cytotoxicity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 10554–10566, doi:10.1021/acsami.7b01886.
151. Debnath, K.; Shekhar, S.; Kumar, V.; Jana, N.R.; Jana, N.R. Efficient Inhibition of Protein Aggregation, Disintegration of Aggregates, and Lowering of Cytotoxicity by Green Tea Polyphenol-Based Self-Assembled Polymer Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 20309–20318, doi:10.1021/ACSAMI.6B06853.
152. Hynie, S.; Smrt, J. Effects of adenosine 5'-phosphate esters with lipid hydroxy compounds (adenosine nucleolipids) on the activity of enzymes of cyclic AMP system. *FEBS Lett.* **1978**, *94*, 339–341, doi:10.1016/0014-5793(78)80971-5.
153. Godeau, G. Amphiphiles bioinspirés dérivés d’acides nucléiques : synthèses, caractérisations et études. <http://www.theses.fr> **2009**.
154. Van Tiel, F.H.; Boere, W.A.M.; Harmsen, T.; Kraaijeveld, C.A.; Snippe, H. Determination of inhibitory concentrations of antiviral agents in cell culture by use of an enzyme immunoassay with virus-specific, peroxidase-labeled monoclonal antibodies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 802–805, doi:10.1128/AAC.27.5.802.

155. Brandish, P.E.; Kimura, K.I.; Inukai, M.; Southgate, R.; Lonsdale, J.T.; Bugg, T.D.H. Modes of action of tunicamycin, liposidomycin B, and mureidomycin A: Inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 1640–1644, doi:10.1128/aac.40.7.1640.
156. Tsvetanova, B.C.; Kiemle, D.J.; Price, N.P.J. Biosynthesis of Tunicamycin and Metabolic Origin of the 11-Carbon Dialdose Sugar, Tunicamine *. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35289–35296, doi:10.1074/JBC.M201345200.
157. Takatsuki, A.; Tamura, G. Tunicamycin, a new antibiotic. II. Some biological properties of the antiviral activity of tunicamycin. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1971**, *24*, 224–231, doi:10.7164/antibiotics.24.224.
158. Isono, K.; Uramoto, M.; Kusakabe, H.; Klmura, K.I.; Izaki, K.; Nelson, C.C.; Mccloskey, J.A. Liposidomycins: Novel nucleoside antibiotics which inhibit bacterial peptidoglycan synthesis. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1985**, *38*, 1617–1621, doi:10.7164/antibiotics.38.1617.
159. Nelson, D.L. (David L.; Nelson, D.L. (David L.; Lehninger, A.L.; Cox, M.M. *Lehninger principles of biochemistry*. **2008**.
160. Moysan, E.; Bastiat, G.; Benoit, J.-P. Gemcitabine versus Modified Gemcitabine: A Review of Several Promising Chemical Modifications. *Mol. Pharm.* **2012**, *10*, 430–444, doi:10.1021/MP300370T.
161. Awasthi, N.; Zhang, C.; Schwarz, A.M.; Hinz, S.; Wang, C.; Williams, N.S.; Schwarz, M.A.; Schwarz, R.E. Comparative benefits of nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 2361–2369, doi:10.1093/carcin/bgt227.
162. Ali, S.M.; Khan, A.R.; Ahmad, M.U.; Chen, P.; Sheikh, S.; Ahmad, I. Synthesis and biological evaluation of gemcitabine-lipid conjugate (NEO6002). *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2571–2574, doi:10.1016/j.bmcl.2005.03.046.
163. Lalanne, M.; Paci, A.; Andrieux, K.; Dereuddre-Bosquet, N.; Clayette, P.; Deroussent, A.; Ré, M.; Vassal, G.; Couvreur, P.; Desmaële, D. Synthesis and biological evaluation of two glycerolipidic prodrugs of didanosine for direct lymphatic delivery against HIV. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2237–2240, doi:10.1016/j.bmcl.2007.01.062.
164. Schoentgen, E. Morphologie, structure et propriétés thermodynamiques des auto-assemblages nucléolipides / acides nucléiques. **2015**.
165. Sivakova, S.; Rowan, S.J. Nucleobases as supramolecular motifs. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 9–21, doi:10.1039/b304608g.
166. Chabaud, P.; Camplo, M.; Payet, D.; Serin, G.; Moreau, L.; Barthélémy, P.; Grinstaff, M.W. Cationic nucleoside lipids for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 466–472, doi:10.1021/bc050162q.
167. Milani, S.; Bombelli, F.B.; Berti, D.; Baglioni, P. Nucleolipoplexes: A new paradigm for phospholipid bilayer-nucleic acid interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11664–11665, doi:10.1021/ja0714134.
168. Moreau, L.; Barthélémy, P.; El Maataoui, M.; Grinstaff, M.W. Supramolecular assemblies of nucleoside phosphocholine amphiphiles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7533–7539, doi:10.1021/ja039597j.

169. Gissot, A.; Camplo, M.; Grinstaff, M.W.; Barthélémy, P. Nucleoside, nucleotide and oligonucleotide based amphiphiles: A successful marriage of nucleic acids with lipids. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1324–1333, doi:10.1039/b719280k.
170. Cuomo, F.; Ceglie, A.; Colafemmina, G.; Germani, R.; Savelli, G.; Lopez, F. Polyadenylic acid binding on cationic liposomes doped with the non-ionic nucleolipid Lauroyl Uridine. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**, *82*, 277–282, doi:10.1016/J.COLSURFB.2010.08.025.
171. Tsiourvas, D.; Sideratou, Z.; Haralabakopoulos, A.A.; Pistolis, G.; Paleos, C.M. Molecular recognition of amphiphilic di(dodecyl)barbituric acid with long-chain alkylated adenine and thymine derivatives. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 14087–14092, doi:10.1021/jp9603344.
172. Overberger, C.G.; Inaki, Y. Graft copolymers containing nucleic acid bases and L- α -amino acids. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1979**, *17*, 1739–1758, doi:10.1002/POL.1979.170170616.
173. Israelachvili, J.N.; Mitchell, D.J.; Ninham, B.W. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1977**, *470*, 185–201, doi:10.1016/0005-2736(77)90099-2.
174. Barthélémy, P.; Lee, S.J.; Grinstaff, M. Supramolecular assemblies with DNA. *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 2133–2148, doi:10.1351/PAC200577122133.
175. Oumzil, K.; Ramin, M.A.; Lorenzato, C.; Hémadou, A.; Laroche, J.; Jacobin-Valat, M.J.; Mornet, S.; Roy, C.-E.; Kauss, T.; Gaudin, K. Solid Lipid Nanoparticles for Image-Guided Therapy of Atherosclerosis., doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00590i.
176. Swastika; Chaturvedi, S.; Kaul, A.; Hazari, P.P.; Jha, P.; Pal, S.; Lal, S.; Singh, B.; Barthélémy, P.; Mishra, A.K. Evaluation of BBB permeable nucleolipid (NLDPU): A di-C15-ketalised palmitone appended uridine as neuro-tracer for SPECT. *Int. J. Pharm.* **2019**, *565*, 269–282, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.04.074.
177. Cunha, A.; Prévot, G.; Mousli, Y.; Barthélémy, P.; Crauste-Manciet, S.; Dehay, B.; Desvergnès, V. Synthesis and Intracellular Uptake of Rhodamine-Nucleolipid Conjugates into a Nanoemulsion Vehicle. *ACS Omega* **2020**, doi:10.1021/acsomega.9b03992.
178. Mindell, J.A. Lysosomal acidification mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* **2012**, *74*, 69–86, doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142317.
179. Godeau, G.; Barthélémy, P. Glycosyl-Nucleoside Lipids as Low-Molecular-Weight Gelators†. *Langmuir* **2009**, *25*, 8447–8450, doi:10.1021/LA900140B.
180. Latxague, L.; Patwa, A.; Amigues, E.; Barthélémy, P. Glycosyl-Nucleolipids as New Bioinspired Amphiphiles. *Mol. 2013, Vol. 18, Pages 12241-12263* **2013**, *18*, 12241–12263, doi:10.3390/MOLECULES181012241.
181. Arigon, J.; Prata, C.A.H.; Grinstaff, M.W.; Barthélémy, P. Nucleic acid complexing glycosyl nucleoside-based amphiphile. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 864–872, doi:10.1021/bc050029y.
182. Moreau, L.; Ziarelli, F.; Grinstaff, M.W.; Barthélémy, P. Self-assembled microspheres from f-block elements and nucleoamphiphiles. *Chem. Commun.* **2006**, 1661–1663, doi:10.1039/B601038E.

183. Moreau, L.; Barthélémy, P.; Li, Y.; Luo, D.; Prata, C.A.H.; Grinstaff, M.W. Nucleoside phosphocholine amphiphile for in vitro DNA transfection. *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 260–264, doi:10.1039/B503302K.
184. Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1978**, *17*, 522–524, doi:10.1002/ANIE.197805221.
185. Tsakos, M.; Schaffert, E.S.; Clement, L.L.; Villadsen, N.L.; Poulsen, T.B. Ester coupling reactions – an enduring challenge in the chemical synthesis of bioactive natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 605–632, doi:10.1039/C4NP00106K.
186. Fan, H.; Kitagawa, M.; Raku, T.; Tokiwa, Y. Enzymatic transesterification of purine nucleoside having a low solubility in organic medium. *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26*, 1261–1264, doi:10.1023/B:BILE.0000044869.77542.0c.
187. Du, L.-H.; Shen, J.-H.; Dong, Z.; Zhou, N.-N.; Cheng, B.-Z.; Ou, Z.-M.; Luo, X.-P. Enzymatic synthesis of nucleoside analogues from uridines and vinyl esters in a continuous-flow microreactor. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 12614–12618, doi:10.1039/C8RA01030G.
188. Montesarchio, D.; Mangiapia, G.; Vitiello, G.; Musumeci, D.; Irace, C.; Santamaria, R.; D’Errico, G.; Paduano, L. A new design for nucleolipid-based Ru(III) complexes as anticancer agents. *Dalt. Trans.* **2013**, *42*, 16697–16708, doi:10.1039/C3DT52320A.
189. Simeone, L.; Mangiapia, G.; Irace, C.; Di Pascale, A.; Colonna, A.; Ortona, O.; De Napoli, L.; Montesarchio, D.; Paduano, L. Nucleolipid nanovectors as molecular carriers for potential applications in drug delivery. *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 3075–3086, doi:10.1039/c1mb05143a.
190. Huang, J.; Ding, D.; Zhang, Z.; Shi, B.; Liang, Y. Synthesis of novel nucleolipid amphiphiles. *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 681–690, doi:10.1080/00397919708003342.
191. Gangadhara, K.L.; Srivastava, P.; Rozenski, J.; Mattelaer, H.P.; Leen, V.; Dehaen, W.; Hofkens, J.; Lescrinier, E.; Herdewijn, P. Design and synthesis of nucleolipids as possible activated precursors for oligomer formation via intramolecular catalysis: Stability study and supramolecular organization. *J. Syst. Chem.* **2014**, *5*, doi:10.1186/s13322-014-0005-3.
192. Liang, L.; Astruc, D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2933–2945, doi:10.1016/j.ccr.2011.06.028.
193. Rostovtsev, V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
194. Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064, doi:10.1021/jo011148j.
195. Zhang, D.; Liu, Q.; Visvanathan, R.; Tuchband, M.R.; Sheeta, G.H.; Fairbanks, B.D.; Clark, N.A.; Smalyukh, I.I.; Bowman, C.N. A supramolecular hydrogel prepared from a thymine-containing artificial nucleolipid: Study of assembly and lyotropic mesophases. *Soft Matter* **2018**, *14*, 7045–7051, doi:10.1039/c8sm01383g.
196. Latxague, L.; Gaubert, A.; Maleville, D.; Baillet, J.; Ramin, M.A.; Barthélémy, P.

- Carbamate-based bolaamphiphile as low-molecular-weight hydrogelators. *Gels* **2016**, *2*, 25, doi:10.3390/gels2040025.
197. Rowan, A.S.; Nicely, N.I.; Cochrane, N.; Wlassoff, W.A.; Claiborne, A.; Hamilton, C.J. Nucleoside triphosphate mimicry: A sugar triazolyl nucleoside as an ATP-competitive inhibitor of *B. anthracis* pantothenate kinase. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4029–4036, doi:10.1039/B909729E.
 198. Bonache, M.C.; Chamorro, C.; Lobatón, E.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Velázquez, S.; Camarasa, M.J.; San-Félix, A. Structure-activity relationship studies on a novel family of specific HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Antivir. Chem. Chemother.* **2003**, *14*, 249–262, doi:10.1177/095632020301400504.
 199. Prabhakar, S.; Vivès, T.; Ferrières, V.; Benvegna, T.; Legentil, L.; Lemiègre, L. A fully enzymatic esterification/transesterification sequence for the preparation of symmetrical and unsymmetrical trehalose diacyl conjugates. *Green Chem.* **2017**, *19*, 987–995, doi:10.1039/c6gc02680j.
 200. Hurst, D.T.; McInnes, A.G. The alcoholysis of trialkylalkoxysilanes: part II. The preparation and chemistry of methyl 2,3,4-tri-O-tri-methylsilyl- α -D-glucopyranoside. *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 2004–2011, doi:10.1139/v65-269.
 201. Gensler, W.J.; Alam, I. Trehalose covalently conjugated to bovine serum albumin. *J. Org. Chem.* **2002**, *42*, 130–135, doi:10.1021/JO00421A026.
 202. Burek, M.; Wandzik, I. Trehalose-Rich, Degradable Hydrogels Designed for Trehalose Release under Physiologically Relevant Conditions. *Polym.* **2019**, *Vol. 11*, Page 2027 **2019**, *11*, 2027, doi:10.3390/POLYM11122027.
 203. Latxague, L.; Ziane, S.; Chassande, O.; Patwa, A.; Dalila, M.J.; Barthélémy, P. Glycosylated nucleoside lipid promotes the liposome internalization in stem cells. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12598–12600, doi:10.1039/C1CC13948G.
 204. Hibert, G.; Fauquignon, M.; Le Meins, J.F.; Pintori, D.; Grau, E.; Lecommandoux, S.; Cramail, H. Organogels from trehalose difatty ester amphiphiles. *Soft Matter* **2019**, *15*, 956–962, doi:10.1039/c8sm02244e.
 205. Latxague, L.; Ramin, M.A.; Appavoo, A.; Berto, P.; Maisani, M.; Ehret, C.; Chassande, O.; Barthélémy, P. Control of Stem-Cell Behavior by Fine Tuning the Supramolecular Assemblies of Low-Molecular-Weight Gelators. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54*, 4517–4521, doi:10.1002/ANIE.201409134.
 206. Hibert, G.; Fauquignon, M.; Le Meins, J.F.; Pintori, D.; Grau, E.; Lecommandoux, S.; Cramail, H. Organogels from trehalose difatty ester amphiphiles. *Soft Matter* **2019**, *15*, 956–962, doi:10.1039/c8sm02244e.
 207. Ji, S.; Jia, C.; Cao, D.; Li, S.; Zhang, X. Direct and selective enzymatic synthesis of trehalose unsaturated fatty acid diesters and evaluation of foaming and emulsifying properties. *Enzyme Microb. Technol.* **2020**, *136*, doi:10.1016/j.enzmictec.2020.109516.
 208. Fredholm, B.B.; Chen, J.F.; Cunha, R.A.; Svenningsson, P.; Vaugeois, J.M. Adenosine and Brain Function. *Int. Rev. Neurobiol.* **2005**, *63*, 191–270, doi:10.1016/S0074-7742(05)63007-3.
 209. Cunha, R.A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signal.* **2005**, *1*, 111, doi:10.1007/S11302-005-0649-

- 1.
210. Gaudin, A.; Yemisci, M.; Eroglu, H.; Lepetre-Mouelhi, S.; Turkoglu, O.F.; Dönmez-Demir, B.; Caban, S.; Sargon, M.F.; Garcia-Argote, S.; Pieters, G.; et al. Squalenoyl adenosine nanoparticles provide neuroprotection after stroke and spinal cord injury. *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9*, 1054–1062, doi:10.1038/nnano.2014.274.
211. Tararov, V.I.; Kolyachkina, S. V.; Alexeev, C.S.; Mikhailov, S.N. N6-acetyl-2,3,5-tri-O-acetyladenosine; A convenient, missed out substrate for regioselective N6-alkylations. *Synthesis (Stuttg.)*. **2011**, 2483–2489, doi:10.1055/S-0030-1260090.
212. Corey, E.J.; Venkateswarlu, A. Protection of hydroxyl groups as tert-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *94*, 6190–6191, doi:10.1021/JA00772A043.
213. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. Organic chemistry. *Oxford Univ. Press Inc.* **2001**, *40*, 1990–1992.
214. Kaburagi, Y.; Kishi, Y. Operationally simple and efficient workup procedure for TBAF-mediated desilylation: Application to halichondrin synthesis. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 723–726, doi:10.1021/ol063113h.
215. Phillip Cox, D.; Terpinski, J.; Lawrynnowicz, W. “Anhydrous” tetrabutylammonium fluoride: A mild but highly efficient source of nucleophilic fluoride ion. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3216–3219, doi:10.1021/jo00191a035.
216. Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. Protective Groups in Organic Synthesis. *Prot. Groups Org. Synth.* **1999**, 1082, doi:10.1002/0471220574.
217. Pilcher, A.S.; Ammon, H.L.; DeShong, P. Utilization of Tetrabutylammonium Triphenylsilyldifluoride as a Fluoride Source for Nucleophilic Fluorination. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *117*, 5166–5167, doi:10.1021/JA00123A025.
218. Jarowicki, K.; Kocienski, P. Protecting groups. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 4005–4037, doi:10.1039/A803688H.
219. Lee, A.S.-Y.; Yeh, H.-C.; Shie, J.-J. A novel, highly efficient and selective desilylating method for trialkylsilyl ethers. *Tetrahedron Lett.* **39**, 5249–5252.
220. Khan, A.T.; Mondal, E. A highly efficient and useful synthetic protocol for the cleavage of tert-butyldimethylsilyl (TBS) ethers using a catalytic amount of acetyl chloride in dry methanol. *Synlett* **2003**, 694–698, doi:10.1055/S-2003-38360.
221. Lu, G.; Wang, D.; Ren, J.; Ke, Y.; Zeng, B.B. Catalytic removal of tert-butyldimethylsilyl (TBS) ether by PVP-I. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60*, 150831, doi:10.1016/J.TETLET.2019.05.059.
222. Birkett, S.; Ganame, D.; Hawkins, B.C.; Meiries, S.; Quach, T.; Rizzacasa, M.A. Total synthesis of the proposed structure of 8-deshydroxyajudazol a: A modified approach to 2,4-disubstituted oxazoles. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 116–123, doi:10.1021/jo302055w.
223. Zhang, W.; Robins, M.J. Removal of silyl protecting groups from hydroxyl functions with ammonium fluoride in methanol. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1177–1180, doi:10.1016/S0040-4039(00)91889-6.
224. Direction européenne de la qualité du médicament *La Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) 10e Édition*; 2019;

225. Benizri, S.; Ferey, L.; Alies, B.; Mebarek, N.; Vacher, G.; Appavoo, A.; Staedel, C.; Gaudin, K.; Barthélémy, P. Nucleoside-Lipid-Based Nanocarriers for Sorafenib Delivery. *Nanoscale Res. Lett.* **2018**, *13*, doi:10.1186/S11671-017-2420-2.
226. Ziouziou, H.; Paris, C.; Benizri, S.; Le, T.K.; Andrieu, C.; Nguyen, D.T.; Appavoo, A.; Taïeb, D.; Brunel, F.; Oueslati, R.; et al. Nucleoside-Lipid-Based Nanoparticles for Phenazine Delivery: A New Therapeutic Strategy to Disrupt Hsp27-eIF4E Interaction in Castration Resistant Prostate Cancer. *Pharm.* **2021**, *Vol. 13, Page 623* **2021**, *13*, 623, doi:10.3390/PHARMACEUTICS13050623.
227. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1–R4, doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0.
228. Devissaguet, J.P.; Fessi, H. Process for the preparaton of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules US. *US 5049322 A* **2015**, 1–12.
229. Schubert, S.; Joseph T. Delaney, J.; Schubert, U.S. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter* **2011**, *7*, 1581–1588, doi:10.1039/C0SM00862A.
230. Zielinska, A.; Carreiró, F.; Oliveira, A.M.; Neves, A.; Pires, B.; Nagasamy Venkatesh, D.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Eder, P.; Silva, A.M.; et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/MOLECULES25163731.
231. Martínez Rivas, C.J.; Tarhini, M.; Badri, W.; Miladi, K.; Greige-Gerges, H.; Nazari, Q.A.; Galindo Rodríguez, S.A.; Román, R.Á.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532*, 66–81, doi:10.1016/J.IJPHARM.2017.08.064.
232. Miladi, K.; Sfar, S.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. *Polym. Nanoparticles Nanomedicines* **2016**, *445*, 17–53, doi:10.1007/978-3-319-41421-8_2.
233. Kumar, A.; Dixit, C.K. Methods for characterization of nanoparticles. In *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*; Elsevier, 2017; pp. 43–58 ISBN 9780081005637.
234. Evers, M.J.W.; Kulkarni, J.A.; Meel, R. van der; Cullis, P.R.; Vader, P.; Schiffelers, R.M. State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Small Methods* **2018**, *2*, 1700375, doi:10.1002/SMTD.201700375.
235. Mainard, M.; Jacob, D. Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. *Photoniques* **2016**, 40–44, doi:10.1051/PHOTON/20168340.
236. Uranyless Available online: <https://uranyless.com/fr/home-page/> (accessed on Oct 4, 2021).
237. English, C.A.; Hyde, J.M.; Robert Odette, G.; Lucas, G.E.; Tan, L. Research Tools: Microstructure, Mechanical Properties, and Computational Thermodynamics. *Struct. Alloy. Nucl. Energy Appl.* **2019**, 103–161, doi:10.1016/B978-0-12-397046-6.00004-6.
238. Hayner, G.A.; Khetan, S.; Paulick, M.G. Quantification of the Disaccharide Trehalose from Biological Samples: A Comparison of Analytical Methods. *ACS Omega* **2017**, *2*,

5813–5823, doi:10.1021/ACSOMEGA.7B01158.

239. Arisoy, S.; Sayiner, O.; Comoglu, T.; Onal, D.; Atalay, O.; Pehlivanoglu, B. In vitro and in vivo evaluation of levodopa-loaded nanoparticles for nose to brain delivery. *Pharm. Dev. Technol.* **2020**, *25*, 735–747, doi:10.1080/10837450.2020.1740257.
240. Ruocco, N.; Costantini, S.; Costantini, M. Blue-print autophagy: Potential for cancer treatment. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, doi:10.3390/MD14070138.
241. Hansen, T.E.; Johansen, T. Following autophagy step by step. *BMC Biol.* *2011* **9**, 1–4, doi:10.1186/1741-7007-9-39.
242. Passos Gibson, V.; Derbali, R.M.; Phan, H.T.; Tahiri, H.; Allen, C.; Hardy, P.; Chain, J.L. Survivin silencing improved the cytotoxicity of carboplatin and melphalan in Y79 and primary retinoblastoma cells. *Int. J. Pharm.* **2020**, *589*, doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119824.
243. Cyphert, E.L.; Wallat, J.D.; Pokorski, J.K.; Recum, H.A. Von Erythromycin Modification That Improves Its Acidic Stability while Optimizing It for Local Drug Delivery. *Antibiot.* *2017*, *Vol. 6*, *Page 11* **2017**, *6*, *11*, doi:10.3390/ANTIBIOTICS6020011.
244. HLB Predictor | ChemAxon Docs Available online: <https://docs.chemaxon.com/display/docs/hlb-predictor.md> (accessed on Oct 4, 2021).
245. Davies, J. A Quantitative Kinetic Theory of Emulsion Type. I Physical Chemistry of the Emulsifying Agent. *Gas/Liquid Liq. Interfaces.* **2003**, 426–438.
246. Griffin, W.C. Classification of surface-active agents by “HLB.” *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1946**, *1*, 311–326.
247. Megazyme International Trehalose assay procedure. *Megazyme Int.* **2020**.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

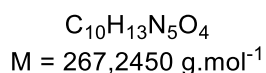
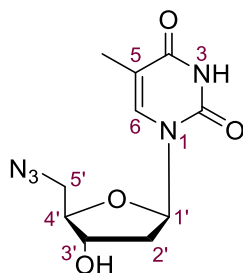
Chapitre VII- Synthèses

Les produits chimiques et solvants disponibles dans le commerce (Fluka, Sigma-Aldrich, Alfa-Aesar) ont été utilisés tels qu'ils ont été reçus, sauf indication contraire. Toutes les réactions ont été effectuées sous atmosphère inerte (argon), en utilisant des solvants anhydres lorsque cela était nécessaire. Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur des plaques en aluminium de gel de silice 60 F254 (Merck). La détection a été effectuée en utilisant des solutions d' H_2SO_4 dans de l'éthanol (concentration 10%) ou des solutions aqueuses de KMnO_4 à 1% suivies par une étape de chauffage ou sous une lampe UV (254 nm). Les chromatographies flash ont été réalisées sur gel de silice (0,043-0,063 nm).

La caractérisation des composés a été obtenue par RMN 1D : ^1H et ^{13}C , RMN 2D : COSY et HSQC, au moyen d'un appareil Bruker Avance 300 (^1H : 300,13 MHz, ^{13}C : 75,46 MHz), Bruker Avance DPX 500 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz) et un spectromètre Bruker Avance III 600 (^1H : 600 MHz). Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) et les constantes de couplage J en Hertz (Hz). Les multiplicités sont indiquées comme suit : singulet (s), doublet (d), doublet de doublet (dd), doublet de doublet dédoublé (ddd), triplet (t), doublet de triplet (dt), quadruplet (q) ou multiplet (m) pour les plus complexes. Pour les analyses ESI HRMS, un appareil Waters Micromass ZQ - équipé d'une source *Electrospray* - a été utilisé en mode positif et/ou négatif. Des analyses de spectrométrie de masse MALDI TOF ont été effectuées sur un spectromètre de masse PerDise Biosystems Voyager-De Pro MALDI en mode linéaire en utilisant de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque comme matrice.

1- Synthèse de GNL en série thymidine

Composé 1 : 5'-azido-5'-désoxythymidine

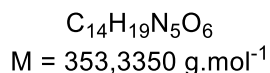
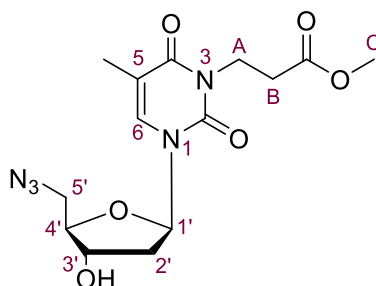


À une solution de thymidine (2 g, 8,26 mmol) dans 40 mL de DMF anhydre on ajoute successivement 1,2 éq. de triphénylphosphine (2,6 g, 9,91 mmol), 5 éq. d'azoture de sodium (2,68 g, 41,3 mmol) et 1,2 éq. de tétrabromure de carbone (3,29 g, 9,91 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 h puis traité avec 50 mL d'une solution aqueuse de NaHCO_3 (5 % m/v) et agité 30 min supplémentaires. Le produit est extrait au DCM, les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau et séchées sur Na_2SO_4 . Après concentration sous pression réduite, le solide obtenu est chromatographié sur colonne de gel de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM (1 % à 5 % v/v) pour conduire au composé **1** désiré sous la forme d'un solide blanc (1,63 g, 74 %). Les analyses RMN sont en accord avec les données de la littérature [197].

Rf : 0,37 (95/5 DCM/MeOH).

^1H RMN (300 MHz, MeOD) δ (ppm) : 1.90 (d, $J= 0.9$ Hz, 3H, CH_3 thymidine), 2.25-2.33 (m, 2H, H_2), 3.56 (dd, $J= 3.9$ Hz, 13.2 Hz, 1H, $\text{H}_{5a'}$), 3.66 (dd, $J= 5.1$ Hz, 13.5 Hz, 1H, $\text{H}_{5b'}$), 3.96 (q, $J= 3.9$ Hz, 9 Hz, 2H, H_4'), 4.32-4.37 (m, 1H, H_3'), 6.27 (t, $J= 6.9$ Hz, 1H, H_1'), 7.54 (s, 1H, H_6).

Composé 2 : 3-(5'-azido-5'-désoxythymidin-3-yl)propanoate de méthyle



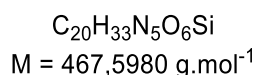
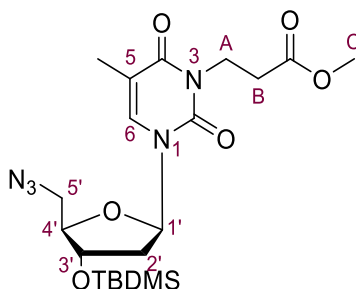
À une solution du composé 1 (500 mg, 1,87 mmol) dans 2 mL de DMF on additionne successivement 1,55 éq. de DBU (433 μL , 2,90 mmol) et 1,55 éq. d'acrylate de méthyle (261 μL , 2,90 mmol). Le mélange est agité à 60°C pendant 16 h avant élimination des solvants sous pression réduite. L'huile jaune obtenue est purifiée sur colonne de gel de silice en utilisant un gradient de méthanol dans le DCM (2 % à 4 % v/v) pour conduire au composé 2 sous la forme d'huile incolore (436 mg, 66 %).

Rf : 0,43 (94/6 DCM/MeOH).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1.89 (d, $J= 0.9$ Hz, 3H, CH_3 thymidine), 2.09-2.23 (m, 1H, $\text{H}_{2'a}$), 2.28-2.41 (m, 1H, $\text{H}_{2'b}$), 2.59 (t, $J= 7.5$ Hz, 2H, H_B espaceur), 3.55 (dd, $J= 3.6$ Hz, 13.2 Hz, 1H, $\text{H}_{5a'}$), 3.68 (dd, $J= 3.0$ Hz, 12.9 Hz, 1H, $\text{H}_{5b'}$), 3.62 (s, 3H, H_C espaceur), 4.01 (q, $J= 3.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{4'}$), 4.18 (t, $J= 7.8$ Hz, 2H, H_A espaceur), 4.33-4.43 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 6.26 (t, $J= 6.9$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 7.34 (s, 1H, H_6).

^{13}C RMN (75.46 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 13.3 (CH_3 thymidine), 32.1 ($\text{CH}_2\text{-B}$ espaceur), 37.2 ($\text{CH}_2\text{-A}$ espaceur), 40.2 ($\text{C}_{2'}$), 51.9 ($\text{CH}_3\text{-C}$ espaceur), 52.2 ($\text{C}_{5'}$), 71.4 ($\text{C}_{3'}$), 84.5 ($\text{C}_{4'}$), 85.5 ($\text{C}_{1'}$), 110.4 (C_5), 133.9 (C_6), 150.6 (C=O thymidine), 163.2 (C=O thymidine), 171.9 (C=O espaceur).

Composé 3 : 3-[3'-O-(tert-butyldiméthylsilyl)-5'-azido-5'-désoxythymidin-3-yl]propanoate de méthyle



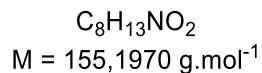
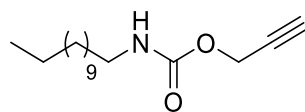
À une solution du composé **2** (430 mg, 1,22 mmol) dans 2,6 mL de DMF on ajoute successivement 1,2 éq. de TBDMSCl (220 mg, 1,46 mmol) puis 1,2 éq. d'imidazole (99 mg, 1,46 mmol). L'ensemble est agité pendant 12 h à T.A. puis dilué au moyen de DCM avant filtration sur coton du précipité formé. Le filtrat est ensuite dilué dans 10 mL de toluène et le DMF co-éaporé sous pression réduite. L'huile jaune obtenue est purifiée sur colonne de gel de silice éluee avec un mélange d'éther de pétrole/EtOAc (70:30) afin d'obtenir le composé **3** sous forme d'une huile incolore (491 mg, 86 %).

Rf : 0,63 (70/30 éther de pétrole/EtOAc).

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : -0.05 (s, 6H, CH_3 -Si), 0.75 (s, 9H, tBu), 1.80 (s, 3H, CH_3 thymidine), 1.97-2.24 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.49 (t, $J= 7.5$ Hz, 2H, H_B espaceur), 3.38 (dd, $J= 3.9$ Hz, 13.5 Hz, 1H, $H_{5a'}$), 3.48-3.59 (m, 4H, H_C espaceur et $H_{5b'}$), 3.78-3.85 (m, 1H, $H_{4'}$), 4.09 (t, $J= 7.8$ Hz, 2H, H_A espaceur), 4.19-4.27 (m, 1H, $H_{3'}$), 6.13 (t, $J= 6.6$ Hz, 1H, $H_{1'}$), 7.20 (s, 1H, H_6).

^{13}C RMN (75.46 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : -5.17 (CH_3 -Si), -4.95 (CH_3 -Si), 13.0 (CH_3 thymidine), 17.6 (C_q tBu), 25.4 (CH_3 tBu), 31.8 (CH_2 -B espaceur), 36.8 (CH_2 -A espaceur), 40.4 ($C_{2'}$), 51.4 (CH_3 -C espaceur), 51.5 ($C_{5'}$), 71.5 ($C_{3'}$), 84.6 ($C_{4'}$), 85.3 ($C_{1'}$), 110.0 (C_5), 133.4 (C_6), 150.3 (C=O thymidine), 162.7 (C=O thymidine), 171.3 (C=O espaceur).

Composé 4 : N-dodécylcarbamate de propargyle



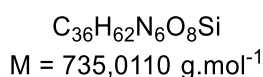
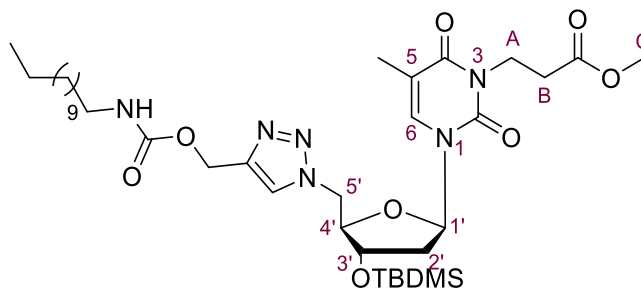
À une solution de dodécylamine (400 mg, 2,16 mmol) dans 6 mL de DCM on ajoute 1,05 éq. de triéthylamine (229 mg, 2,27 mmol) puis au goutte à goutte 1 éq. de chloroformate de propargyle (256 mg, 2,16 mmol) à 0°C. Le mélange est agité pendant 3 h à cette température. Après évaporation des solvants sous pression réduite, le produit brut est élué sur colonne de gel de silice avec un mélange éther de pétrole/EtOAc (90:10) pour fournir le composé **4** (333 mg, 97%).

Rf : 0,61 (90/10 éther de pétrole/EtOAc).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.72-0.85 (m, 3H, CH₃ lipide), 1.19 (s, 18H, CH₂ lipide), 1.37-1.52 (m, 2H, CH₂-CH₃ lipide), 2.40 (s, 1H, CH propargyle), 3.03-3.17 (m, 2H, CH₂-NH lipide), 4.60 (s, 2H, CH₂ propargyle), 4.99-5.24 (s large, 1H, NH lipide).

¹³C RMN (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 14.1 (CH₃ lipide), 22.7 (CH₂ lipide), 26.7 (CH₂ lipide), 29.3 (CH₂ lipide), 29.3 (CH₂ lipide), 29.5 (CH₂ lipide), 29.6 (CH₂ lipide), 29.6 (CH₂ lipide), 29.6 (CH₂ lipide), 29.8 (CH₂-CH₃ lipide), 31.9 (CH₂ lipide), 41.2 (CH₂-NH lipide), 52.2 (CH₂ propargyle), 74.4 (CH propargyle), 78.4 (C propargyle), 155.5 (C=O lipide).

Composé 5 : 3'-[3'-O-(tert-butylidiméthylsilyl)-5'-{4-[dodécylcarbamoyloxy)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-5'-désoxythymidin-3-yl]propanoate de méthyle



À une solution des composés **3** (316 mg, 0,68 mmol) et **4** (181 mg, 0,68 mmol, 1 éq.) dans 5 mL d'un mélange H₂O/THF (1:1), on ajoute 0,1 éq. de sulfate de cuivre pentahydrate (11 mg, 0,07 mmol) et 0,2 éq. d'ascorbate de sodium (27 mg, 0,14 mmol) puis le mélange est agité à 60°C pendant 4 h. Les solvants sont évaporés sous pression réduite afin pour conduire à un solide vert. Ce brut a été lavé à l'EDTA jusqu'à décoloration des phases organiques, puis élué sur colonne de gel de silice avec un mélange DCM/MeOH (95:5) pour donner le composé **5** sous forme d'un solide blanc (433 mg, 87 %).

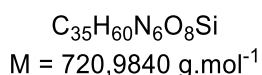
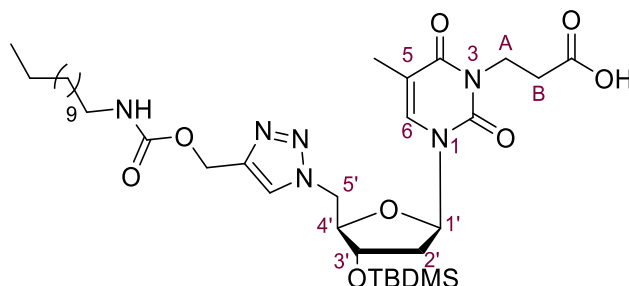
Rf : 0,33 (95/5 DCM/MeOH).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.04-0.07 (m, 6H, CH₃-Si), 0.78-0.92 (m, 12H, CH₃ lipide et ^tBu), 1.20 (m, 18H, CH₂ lipide), 1.33-1.49 (m, 2H, CH₂-CH₃ lipide), 1.84 (s, 3H, CH₃ thymidine), 2.00-2.77 (m, 2H, H₂), 2.58 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H_B espaceur), 3.03-3.14 (m, 2H, CH₂-NH lipide), 3.62 (s, 3H, H_C espaceur), 4.02-4.11 (m, 1H, H_{4'}), 4.17 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_A espaceur), 4.34-4.48 (m, 1H, H_{3'}), 4.52-4.63 (m, 2H, H_{5'}), 4.93-5.04 (m, 1H, NH lipide), 5.10 (s, 2H, O-CH₂ triazole), 6.15 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H_{1'}), 6.60 (s, 1H, H₆), 7.66 (s, 1H, CH triazole).

¹³C RMN (75.46MHz, CDCl₃) δ (ppm) : -4.81 (CH₃-Si), -4.63 (CH₃-Si), 13.2 (CH₃ thymidine), 14.1 (CH₃ lipide), 17.8 (C_q ^tBu), 22.7 (CH₂ lipide), 25.7 (CH₃ ^tBu), 26.7 (CH₂ lipide), 29.3 (CH₂ lipide), 29.3 (CH₂ lipide), 29.6 (CH₂ lipide), 29.6 (CH₂ lipide), 29.6 (CH₂ lipide), 29.8 (CH₂-CH₃ lipide), 29.9 (CH₂ lipide), 31.9 (CH₂ lipide), 32.1 (CH₂-B espaceur), 37.1 (CH₂-A espaceur), 39.5 (C₂), 41.1 (CH₂-NH lipide), 50.5 (C_{5'}), 51.8 (CH₃-C espaceur), 57.7 (O-CH₂ triazole), 71.7 (C_{3'}), 83.9 (C_{4'}), 86.0 (C_{1'}), 110.8 (C₅), 125.6 (CH triazole), 133.8 (C₆), 143.6 (C triazole), 150.5 (C=O thymidine), 156.2 (C=O lipide), 162.9 (C=O thymidine), 171.6 (C=O espaceur).

HRMS (ESI) [M+H⁺] : calculée = 735,44712, trouvée = 735,44576.

Composé 6: Acide 3'-[3'-O-(tert-butylidiméthylsilyl)-5'-{4-[dodécylcarbamoyloxy]méthyl}-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-5'-désoxythymidin-3-yl] propanoïque



Le composé **5** (431 mg, 0,59 mmol) dissous dans 13 mL de 1,4-dioxane et 1,3 mL de solution 1N de soude dans du méthanol, est agité à T.A. pendant 6 h. Le mélange est ensuite traité avec une solution aqueuse d'HCl à 5% puis les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit brut élué sur colonne de gel de silice avec un mélange DCM/MeOH (90:10) fournit le composé **6** sous la forme d'une huile incolore (310 mg, 73%).

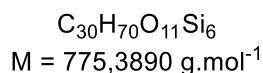
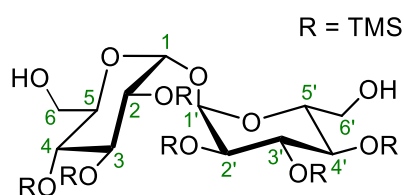
Rf : 0,26 (90/10 DCM/MeOH).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : -0.05-0.05 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{-Si}$), 0.73-0.85 (m, 12H, CH_3 lipide et ^tBu), 1.10-1.27 (m, 18H, CH_2 lipide), 1.29-1.47 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ lipide), 1.79 (s, 3H, CH_3 thymidine), 2.07-2.21 (m, 2H, H_2), 2.37-2.51 (m, 2H, H_B espaceur), 2.89-3.11 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$ lipide), 3.97-4.15 (m, 3H, H_4' et H_A espaceur), 4.30-4.43 (m, 1H, H_3'), 4.50-4.59 (m, 2H, H_5'), 5.07 (s, 2H, O- CH_2 triazole), 5.21-5.31 (m, 1H, NH lipide), 6.09 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, H_1'), 6.61 (s, 1H, H_6), 7.67 (s, 1H, CH triazole), 7.75-8.12 (s large, 1H, COOH espaceur).

^{13}C RMN (75.46 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : -4.96 ($\text{CH}_3\text{-Si}$), -4.77 ($\text{CH}_3\text{-Si}$), 13.1 (CH_3 thymidine), 14.0 (CH_3 lipide), 17.7 (C_q tBu), 22.6 (CH_2 lipide), 25.5 (CH_3 ^tBu), 26.7 (CH_2 lipide), 29.2 (CH_2 lipide), 29.2 (CH_2 lipide), 29.3 (CH_2 lipide), 29.4 (CH_2 lipide), 29.5 (CH_2 lipide), 29.5 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$ lipide), 29.8 (CH_2 lipide), 31.8 (CH_2 lipide), 33.6 ($\text{CH}_2\text{-B}$ espaceur), 38.0 ($\text{CH}_2\text{-A}$ espaceur), 39.2 (C_2'), 41.0 ($\text{CH}_2\text{-NH}$ lipide), 50.6 (C_5'), 57.6 (O- CH_2 triazole), 71.8 (C_3'), 84.0 (C_4'), 86.3 (C_1'), 110.5 (C_5), 125.3 (CH triazole), 133.8 (C_6), 143.5 (C triazole), 150.4 (C=O thymidine), 156.1 (C=O lipide), 162.9 (C=O thymidine), 175.9 (C=O espaceur).

HRMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}^+]$: calculée = 721,43147, trouvée = 721,43198.

Composé 7 : 2, 2', 3, 3', 4, 4'-hexa-*O*-(triméthylsilyl)- α,α' -D-tréhalose



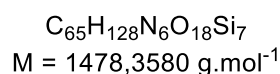
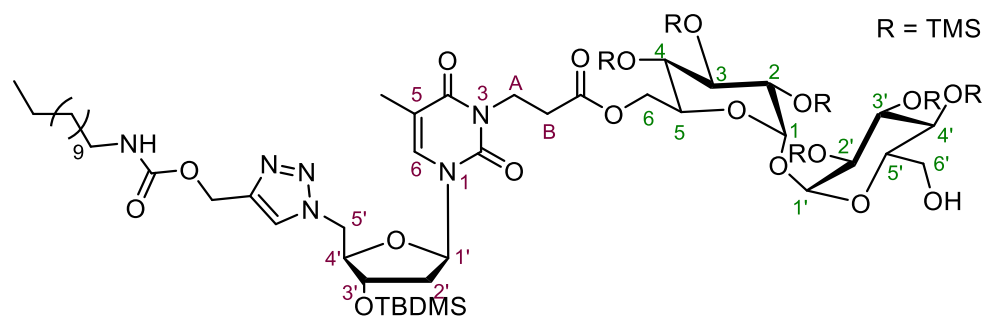
Le tréhalose dihydrate commercial (500 mg, 1,32 mmol) est co-évaaporé sous pression réduite au moyen de DMF (3x10 mL) avant dissolution dans 4 mL de DMF. On ajoute ensuite successivement 8,6 éq. de N,O-bis(triméthylsilyl)acétamide (2,78 mL, 11,37 mmol) et 0,06 éq. d'une solution 1M de TBAF dans le THF (79 μL , 0,08 mmol). Le mélange est agité pendant 4 h à T.A. puis dilué dans 60 mL de MeOH avant l'ajout de 0,11 éq. de K_2CO_3 (20 mg, 0,145 mmol) et laissé sous agitation pendant 3h30 supplémentaires à 0°C. Une fois la réaction terminée, le produit est extrait à l'acétate d'éthyle puis les phases organiques rassemblées séchées sur Na_2SO_4 . Après concentration sous pression réduite, le brut est élué sur colonne de gel de silice avec un mélange éther de pétrole/AcOEt/ Et_3N (80:19:1) pour récupérer le composé 7 sous la forme d'un solide blanc (530 mg, 52%).

Rf : 0,42 (80/19/1 d'éther de pétrole/AcOEt/ NEt_3).

^1H RMN (300 MHz, MeOD) δ (ppm) : 0.12-0.20 (m, 54H, 6 TMS), 1.90 (s large, 2H, OH), 3.48 (dd, 2H, $J = 3.0 \text{ Hz}, 9.3 \text{ Hz}$, H_2, H_2'), 3.49-3.52 (dd, 2H, H_4, H_4'), 3.65-3.71 (m, 4H, H_6, H_6'), 3.83-3.93 (m, 4H, $\text{H}_3, \text{H}_3', \text{H}_5, \text{H}_5'$), 4.96 (d, 2H, H_1, H_1').

^{13}C RMN (75.46 MHz, MeOD) δ (ppm) : 0.34, 1.21, 1.63 (6 TMS), 61.7 (C_6, C_6'), 72.5, 74.4, 74.9 ($\text{C}_2, \text{C}_2', \text{C}_3, \text{C}_3', \text{C}_4, \text{C}_4'$), 74.0 (C_5, C_5'), 95.5 (C_1, C_1').

Composé 8 : 3'-[3'-O-(tert-butylidiméthylsilyl)-5'-{4-[dodécylcarbamoyloxy)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-5'-désoxythymidin-3-yl]propanoate de 2, 2', 3, 3', 4, 4' 6'-hepta-O-(triméthylsilyl)- α,α' -D-tréhalos-6-yle



À une solution des composés **6** (0,175 mg, 0,24 mmol, 1,5 éq.) et **7** (0,126 mg, 0,16 mmol) dans 3 mL de DCM, on ajoute successivement 1,5 éq. de DCC (50 mg, 0,24 mmol) et 0,5 éq. de DMAP (10 mg, 0,08 mmol). Le mélange est agité pendant 6 h à T.A. et le précipité obtenu filtré et lavé au DCM avant évaporation à sec du filtrat sous pression réduite. Le produit brut est élué sur colonne de gel de silice avec un mélange éther de pétrole/AcOEt (75:25) pour obtenir le composé **8** sous forme d'un solide blanc (147 mg, 41 %).

Rf : 0,49 (75/25 d'éther de pétrole/AcOEt).

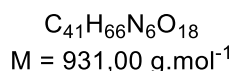
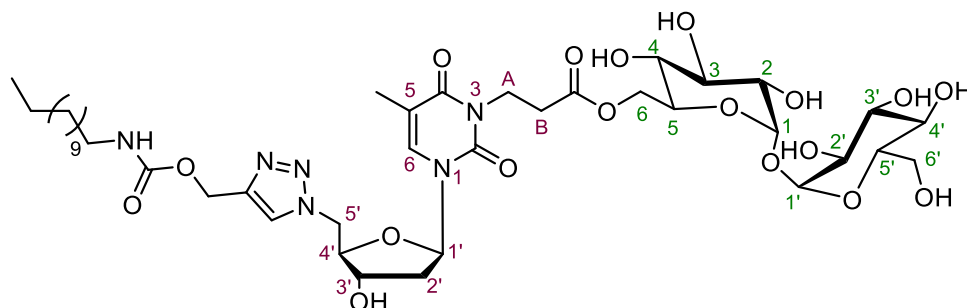
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : -0.01-0.21 (m, 60H, CH₃-Si et OTMS), 0.78-0.93 (m, 12H, CH₃ lipide et ^tBu), 1.15-1.32 (m, 18H, CH₂ lipide), 1.36-1.51 (m, 2H, CH₂-CH₃ lipide), 1.87 (s, 3H, CH₃ thymidine), 1.96-2.13 (m, 1H, H₂'), 2.17-2.31 (m, 1H, H₂'), 2.60-2.75 (m, 2H, H_B espaceur), 3.04-3.16 (m, 2H, CH₂-NH lipide), 3.34-3.51 (m, 4H, H_A espaceur et H₂' tréhalose, H₂' tréhalose), 3.60-3.74 (m, 2H, H₆' tréhalose), 3.77-4.33 (m, 10H, H₄', H₆' tréhalose, H₃' tréhalose, H₃' tréhalose, H₄' tréhalose, H₄' tréhalose, H₅' tréhalose, H₅' tréhalose et OH tréhalose), 4.39-4.47 (m, 1H, H₃''), 4.55-4.61 (m, 2H, H₅''), 4.83-4.91 (d, 2H, H₁' tréhalose, H₁' tréhalose), 4.93-5.02 (m, 1H, NH lipide), 5.13 (s, 2H, O-CH₂ triazole), 6.19 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H₁'), 6.63 (s, 1H, H₆'), 7.69 (s, 1H, CH triazole).

¹³C RMN (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : -4.69 (CH₃-Si), -4.50 (CH₃-Si), 0.48 (OTMS), 1.17 (OTMS), 1.53 (OTMS), 13.3 (CH₃ thymidine), 14.5 (CH₃ lipide), 18.6 (C_q ^tBu), 23.6 (CH₂ lipide), 25.9 (CH₃ ^tBu), 26.2 (CH₂ lipide), 26.6 (CH₂ lipide), 27.7 (CH₂ lipide), 30.2 (CH₂ lipide), 30.3 (CH₂ lipide), 30.6 (CH₂ lipide), 30.7 (CH₂ lipide), 32.9 (CH₂-CH₃ lipide), 33.1 (CH₂-B espaceur), 34.6 (CH₂ lipide), 38.2 (CH₂-A espaceur), 40.2 (C₂''), 41.7 (CH₂-NH lipide),

52.0 (C_{5'}), 58.2 (O-CH₂ triazole), 61.6 (C_{6'} tréhalose), 64.9 (C₆ tréhalose), 71.6, 72.4 (C₂ tréhalose, C_{2'} tréhalose), 73.0 (C_{5'} tréhalose), 73.5 (C_{3'}), 73.7 (C₅ tréhalose), 73.8, 74.4, 74.6, 74.7 (C₃ tréhalose, C_{3'} tréhalose, C₄ tréhalose, C_{4'} tréhalose), 85.9 (C_{4'}), 88.2 (C_{1'}), 95.2, 95.4 (C₁ tréhalose, C_{1'} tréhalose), 111.0 (C₅), 126.7 (CH triazole), 136.5 (C₆), 144.7 (C triazole), 151.6 (C=O thymidine), 158.1 (C=O lipide), 164.8 (C=O thymidine), 172.6 (C=O espaceur).

HRMS (ESI) [M+H⁺] : calculée = 1477,77427, trouvée = 1477,77674.

Composé 9 : 3'-[5'-{4-[dodécylcarbamoyloxy)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-5'-désoxythymidin-3-yl]propanoate de tréhalos-6-yle



À une solution du composé **8** (105 mg, 0,07 mmol) dans 20 mL de MeOH, on ajoute 350 mg de résine échangeuse Dowex 50WX2-100. Le mélange est agité 15 minutes à température ambiante jusqu'à l'achèvement de la réaction. Le mélange est ensuite filtré sur coton et le filtrat concentré sous pression réduite pour donner le composé **9'** (62 mg, 84 %) suffisamment pur pour être utilisé dans l'étape suivante. Au composé **9'** (62 mg, 0,06 mmol) dissous sous agitation dans 1 mL de THF on additionne 1 éq. d'une solution 1M de TBAF dans le THF (62 μ L, 0,06 mmol) à 0°C. L'agitation 2 h à cette température. Une fois la réaction complète et retour à T.A., elle est stoppée par addition d'eau avant ajout de DCM. La phase aqueuse est extraite 3 fois au DCM, les phases organiques sont regroupées et séchées sur Na_2SO_4 . Après filtration et concentration sous pression réduite le résidu est élué sur colonne de gel de silice avec un mélange DCM/MeOH/ H_2O (80 :18,5 : 1,5) pour conduire au composé **9** sous la forme d'un solide blanc (29 mg, 52%).

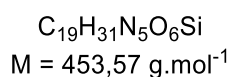
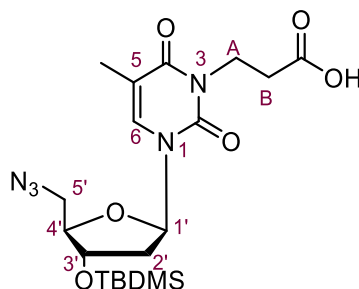
Rf : 0,31 (80/18,5/1,5 DCM/MeOH/ H_2O).

^1H RMN (300 MHz, MeOD) δ (ppm) : 0.84-0.98 (m, 3H, CH_3 lipide), 1.18-1.40 (m, 18H, CH_2 lipide), 1.41-1.55 (m, 2H, CH_2 - CH_3 lipide), 1.92 (s, 3H, CH_3 thymidine), 2.21-2.39 (m, 2H, H_2), 2.65 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H_B espaceur), 2.99-3.09 (m, 2H, CH_2 -NH lipide), 3.25-3.37 (m, 6H, H_2 tréhalose, H_2' tréhalose, H_3 tréhalose, H_3' tréhalose, H_4 tréhalose et H_4' tréhalose), 3.45 (q, $J = 3.9$ Hz, 9.9 Hz, 2H, H_6' tréhalose), 3.70-3.80 (m, 1H, H_5' tréhalose), 3.97-4.05 (m, 1H, H_5 tréhalose), 4.11-4.36 (m, 5H, H_4' , H_A espaceur, H_6 tréhalose), 4.36-4.44 (m, 1H, H_3'), 4.65-4.79 (m, 2H, H_5'), 4.83-5.02 (d, 2H, H_1 tréhalose, H_1' tréhalose), 5.10 (s, 2H, O- CH_2 triazole), 6.15 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, H_1'), 7.23 (s, 1H, H_6), 8.00 (s, 1H, CH triazole).

¹³C RMN (75.46 MHz, MeOD) δ (ppm) : 13.1 (CH₃ thymidine), 14.3 (CH₃ lipide), 23.2 (CH₂ lipide), 25.4 (CH₃ ^tBu), 29.6 (CH₂ lipide), 29.6 (CH₂ lipide), 29.9 (CH₂ lipide), 30.0 (CH₂ lipide), 30.2 (CH₂ lipide), 30.2 (CH₂ lipide), 30.2 (CH₂ lipide), 32.4 (CH₂-CH₃ lipide), 32.8 (CH₂-B espaceur), 34.6 (CH₂ lipide), 34.8 (CH₂-A espaceur), 37.8 (C_{2'}), 39.4 (CH₂-NH lipide), 51.9 (C_{5'}), 62.2 (O-CH₂ triazole), 63.2 (C_{6'} tréhalose), 64.9 (C₆ tréhalose), 69.2, 70.6 (C₂ tréhalose, C_{2'} tréhalose), 70.9 (C_{5'} tréhalose), 71.2 (C_{3'}), 71.5 (C₅ tréhalose), 72.3, 73.0, 73.6, 73.8 (C₃ tréhalose, C_{3'} tréhalose, C₄ tréhalose, C_{4'} tréhalose), 84.6 (C_{4'}), 87.3 (C_{1'}), 94.3, 95.5 (C₁ tréhalose, C_{1'} tréhalose), 110.8 (C₅), 125.3 (CH triazole), 136.9 (C₆), 145.1 (C triazole), 151.2 (C=O thymidine), 155.6 (C=O lipide), 164.2 (C=O thymidine), 172.3 (C=O espaceur).

HRMS (ESI) [M+H⁺] : calculée = 931,45356, trouvée = 931,64586.

Composé 10 : Acide 3'-[3'-O-(tert-butylidiméthylsilyl)-5'azido-5'-désoxythymidin-3-yl]propanoïque



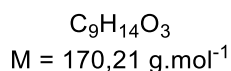
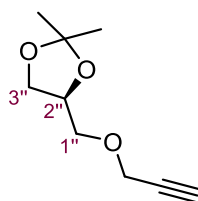
Une solution du composé **3** (472 mg, 1,00 mmol) dans 22 mL de dioxane-1,4 et 2,2 mL de solution de soude méthanolique (1N) est agitée à T.A. pendant 6 h. Le mélange est traité avec une solution aqueuse d'HCl à 5% puis les solvants évaporés sous pression réduite. Le produit brut est élué sur colonne de gel de silice avec un mélange DCM/MeOH (85:15) pour obtenir le composé **10** sous la forme d'un solide blanc (317 mg, 70%).

Rf : 0,32 (85/15 DCM/MeOH).

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : -0.05-0.04 (m, 6H, CH_3 -Si), 0.69-0.83 (m, 9H, tBu), 1.77 (s, 3H, CH_3 thymidine), 2.08-2.29 (m, 2H, H_2), 2.33-2.48 (m, 2H, H_B espaceur), 3.96-4.17 (m, 3H, H_4 et H_A espaceur), 4.27-4.40 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.50-4.56 (m, 2H, $H_{5'}$), 6.11 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, H_1), 6.49 (s, 1H, H_6), 7.70-8.09 (s large, 1H, COOH espaceur).

^{13}C RMN (75.46 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : -5.01 (CH_3 -Si), -4.83 (CH_3 -Si), 13.6 (CH_3 thymidine), 18.1 (C_q tBu), 25.1 (CH_3 tBu), 32.9 (CH_2 -B espaceur), 37.8 (CH_2 -A espaceur), 39.4 (C_2), 51.2 ($C_{5'}$), 72.1 ($C_{3'}$), 83.7 (C_4), 86.2 (C_1), 111.2 (C_5), 131.3 (C_6), 148.9 (C=O thymidine), 160.7 (C=O thymidine), 174.8 (C=O espaceur).

Composé 16 : (4S)-2,2-Diméthyl-4-[(propargyloxy)méthyl]-1,3-dioxolane

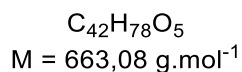
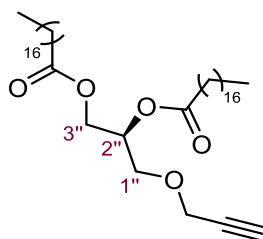


À une solution de 2,3-isopropylidène-*sn*-glycérol (4,8 g, 36,5 mmol) dans 75 mL de toluène à 0°C, on ajoute 1,1 éq. de NaH (60%) (1,6 g, 40,0 mmol) puis le mélange est agité pendant 30 min avant ajout de 1,1 éq. de bromure de propargyle (5,9 g, 40,0 mmol). La suspension orange est agitée pendant 12h à température ambiante sous argon. Le mélange réactionnel est versé dans de l'eau (50 mL) et la phase organique séparée. La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3x50 mL), les phases organiques sont combinées, séchées (Na_2SO_4) et le solvant évaporé sous pression réduite. Le produit brut est élué sur colonne de gel de silice avec un mélange pentane/AcOEt. (70/30) pour donner le composé **16** sous forme d'un liquide incolore (4,97 g, 80%). Les analyses RMN sont en adéquation avec les données de la littérature [203].

Rf : 0,8 (50/50 Pentane/AcOEt).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1.30 (s, 3H, CH_3), 1.37 (s, 3H, CH_3), 2.44 (t, $J= 2.2$ Hz, 1H, CH propargyle), 3.55 (dd, $J= 1.2$ Hz, 6.1 Hz, 2H, $\text{H}_{3''}$), 3.69-3.73 (m, 1H, $\text{H}_{1a''}$), 4.06-4.12 (m, 1H, $\text{H}_{1b''}$), 4.25 (t, $J= 2.3$ Hz, 2H, O- CH_2 propargyle), 4.30 (tt, $J= 6.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$).

Composé 18 : 1,2-Distéaroyl-3-propargyl-*sn*-glycérol

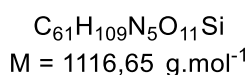
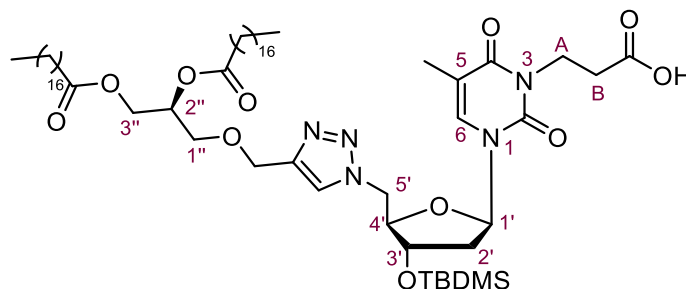


À une solution du composé **16** (4,97 g, 29,2 mmol) dans 128 mL de méthanol on ajoute 10 g de résine échangeuse Dowex 50WX2-100 à T.A. Le mélange est agité jusqu'à l'achèvement de la réaction (environ 20 minutes). Après élimination du solvant sous pression réduite, le glycérol acétylénique déprotégé brut est dissous dans 130 mL de DCM et on ajoute à cette solution 2,5 éq. d'acide stéarique (21 g, 73,0 mmol), 2,5 éq. de DCC (15,0 g, 73,0 mmol) puis 2,5 éq. de DMAP (5,56 g, 73,0 mmol), et le mélange est agité pendant 72 h à T.A.. Après filtration et concentration du filtrat sous pression réduite, le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec un gradient AcOEt dans le méthanol (4 % à 10 % v/v) et le composé **18** obtenu sous forme d'un solide blanc (10,5 g, 55%). Les analyses RMN sont en adéquation avec les données de la littérature [203].

Rf : 0,8 (80/20 DCM/AcOEt).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.93 (t, *J*= 6.4 Hz, 6H, CH₃ lipide), 1.12-1.36 (m, 46H, CH₂ lipide), 1.55-1.72 (m, 4H, CH₂ lipide), 2.27-2.40 (m, 4H, CH₂ lipide), 2.47 (t, *J*= 2.4 Hz, 1H, CH propargyle), 3.66 (d, *J*= 6.0 Hz, 2H, H_{3''}), 4.20-4.23 (m, 3H, O-CH₂ propargyle et H_{1a''}), 4.34-4.41 (m, 1H, H_{1b''}), 5.23-5.27 (m, 1H, H_{2''}).

Composé 20 : Acide 3-[5'-{4[(((2S)-1,2-distéaroyloxy]prop-3-yl)oxy)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-3'-(O-tert-butylidiméthylsilyl)-5'-désoxythymidin-3-yl] propanoïque



À une solution du composé **10** (317 mg, 0,70 mmol) et du composé **18** (464 mg, 0,70 mmol, 1 éq.) dans 5 mL d'un mélange H₂O/THF (1:1), on ajoute 0,1 éq. de sulfate de cuivre pentahydrate (11 mg, 0,07 mmol) et 0,2 éq. d'ascorbate de sodium (27 mg, 0,14 mmol) et le mélange est agité à 60°C pendant 4 h. Les solvants sont évaporés sous pression réduite pour donner un solide vert. Ce brut est lavé à l'EDTA jusqu'à décoloration des phases organiques puis élué sur colonne de gel de silice avec un mélange DCM/MeOH (90:10) pour obtenir le composé **5** sous forme d'un solide blanc (634 mg, 82 %).

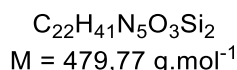
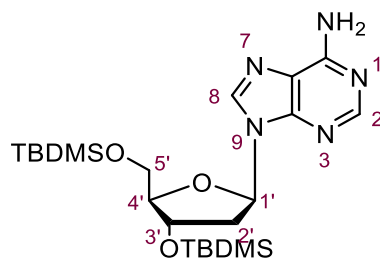
Rf : 0,41 (90/10 DCM/MeOH).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : -0.04-0.03 (m, 6H, CH₃-Si), 0.61-0.92 (m, 15H, CH₃ lipide et ^tBu), 1.10-1.27 (m, 56H, CH₂ lipide), 1.29-1.47 (m, 2H, CH₂-CH₂-C=O lipide), 1.79 (s, 3H, CH₃ thymidine), 2.07-2.21 (m, 6H, H_{2'} et CH₂-CH₂-C=O), 2.36-2.44 (m, 2H, H_B espaceur), 3.63-3.70 (m, 2H, H_{3''}), 4.00-4.16 (m, 4H, H_{4'}, H_{1a''} et H_A espaceur), 4.31-4.50 (m, 2H, H_{3'} et H_{1b''}), 4.51-4.57 (m, 2H, H_{5'}), 5.04-5.12 (m, 1H, H_{2''}), 5.15 (s, 2H, O-CH₂ triazole), 6.18 (t, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 1H, H_{1'}), 6.82 (s, 1H, H₆), 7.70 (s, 1H, CH triazole), 7.82-8.16 (s large, 1H, COOH espaceur).

¹³C RMN (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : -4.92 (CH₃-Si), -4.80 (CH₃-Si), 12.9 (CH₃ thymidine), 14.2 (2 CH₃ lipide), 16.5 (C_q tBu), 21.9 (CH₂ lipide), 24.6 (CH₃ ^tBu), 26.0 (2 CH₂ lipide), 26.5 (3 CH₂ lipide), 28.4 (3, CH₂ lipide), 28.6 (2 CH₂ lipide), 28.7 (CH₂ lipide), 29.0 (CH₂ lipide), 29.1 (CH₂-CH₃ lipide), 29.3 (CH₂ lipide), 31.0 (CH₂ lipide), 32.4 (CH₂-B espaceur), 36.3 (CH₂-A espaceur), 38.8 (C_{2'}), 40.6 (CH₂-NH lipide), 51.3 (C_{5'}), 51.5 (C_{3''}), 56.4 (O-CH₂ triazole), 62.4 (C_{1''}), 69.2 (C_{2''}), 71.3 (C_{3'}), 84.4 (C_{4'}), 87.1 (C_{1'}), 108.3 (C₅), 124.6 (CH triazole), 131.7 (C₆), 142.4 (C triazole), 150.9 (C=O thymidine), 164.2 (C=O thymidine), 170.7 (C=O espaceur), 172.5 (C=O lipide), 173.8 (C=O lipide).

2- Synthèse de GNL en série adénosine

Composé 24 : 3,5'-Bis-O-(tert-butyltriméthylsilyl)-2'-désoxyadénosine



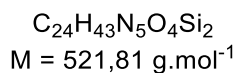
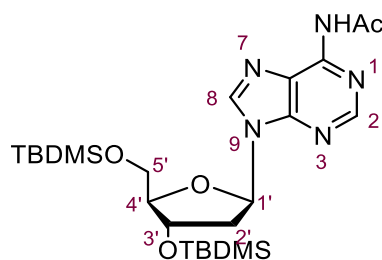
La désoxyadénosine commerciale (5 g, 0,0185 mol) est séchée azéotropiquement par coévaporation à la pyridine puis laissée 12 h sous rampe à vide (1,5 mm Hg, T.A.) avant dissolution dans 55 mL de DMF anhydre. A cette solution on ajoute successivement 3 équ. d'imidazole (3,8 g, 0,0550 mol) et 2 équ. de chlorure de tétrabutyltriméthylsilane (6,13 g, 0,0407 mol). Après 24 h d'agitation à température ambiante, la solution jaune est noyée dans l'eau, l'émulsion blanche résultante concentrée sous pression réduite pour donner un solide blanc à nouveau noyé dans l'eau. Le produit désiré est extrait à l'acétate d'éthyle, la phase organique lavée à l'eau puis à l'eau salée et enfin séchée (Na_2SO_4). Après concentration sous pression réduite, le brut obtenu est recristallisé dans l'hexane pour donner après séchage à la pompe à membrane le produit désiré **24** sous la forme d'un solide blanc (8,28 g, 93%).

Rf : 0,38 (50/50 éther de pétrole/AcOEt).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.11 (s, 12H, $\text{CH}_3\text{-Si}$), 0.93 (s, 18H, ^tBu), 2.42-2.49 (m, 1H, $\text{H}_{2a'}$), 2.59-2.68 (m, 1H, $\text{H}_{2B'}$), 3.77-3.81 (dd, $J = 11.2, 3.1$ Hz, 1H, $\text{H- H}_{5a'}$), 3.87-3.92 (dd, $J = 11.2, 4.0$ Hz, 1H, $\text{H H}_{5b'}$), 4.02 (q, $J = 3.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{4'}$), 4.60-4.65 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 5.85 (s large, 2H, NH_2), 6.48 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 8.19 (s, 1H, H_8), 8.37 (s, 1H, H_2).

^{13}C RMN (75.46 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : -5.46, -5.36, -4.79, -4.64 ($\text{CH}_3\text{-Si}$), 25.77, 25.97 (CH_3 ^tBu), 41.41 ($\text{C}_{2'}$), 62.72 ($\text{C}_{5'}$), 71.78 ($\text{C}_{3'}$), 84.33 ($\text{C}_{1'}$), 87.88 ($\text{C}_{4'}$), 139.22 (C_8), 152.41 (C_2).

Composé 25 : N⁶-Acétyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldiméthylsilyl)-2'-désoxyadénosine



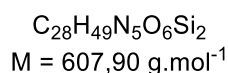
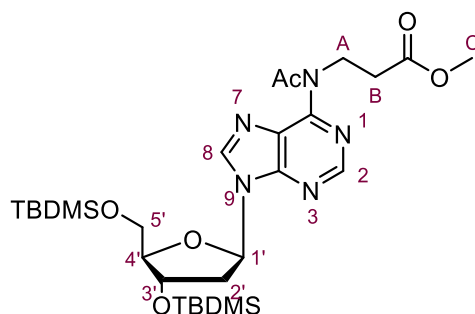
À une solution du composé **24** (5,43 g, 0,0113 mol) dans 20 mL de pyridine anhydre, on ajoute 10 mL d'anhydride acétique. L'ensemble est chauffé à 80°C pendant 24 h. Après refroidissement, l'ensemble est dilué avec 40 mL d'éthanol avant concentration sous pression réduite. Au résidu obtenu on additionne 25 mL de méthanol puis 0,8 éq. d'imidazole (591 mg, 0,0087 mol). Après 24 h d'agitation à T.A., l'ensemble est dilué par ajout d'acétate d'éthyle et la phase organique lavée à l'eau salée, séchée puis concentrée sous pression réduite. Après un séchage de 12 h sous rampe à vide le composé **25** est obtenu sous la forme d'une mousse solide ocre (5,40 g, 91% brut) suffisamment pure pour pouvoir être utilisée ensuite sans autre purification.

Rf : 0,48 (50/50 éther de pétrole/AcOEt).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.03, 0.04 (2s, 6H, CH₃-Si), 0.08 (s, 6H, CH₃-Si), 0.85, 0.88 (2s, 18H, ^tBu), 2.40-2.47 (m, 1H, H_{2a'}), 2.56 (s, 3H, N-Ac), 2.62-2.71 (m, 1H, H_{2b'}), 3.71-3.87 (2dd, *J*= 3.3, 4.3, 11.2 Hz, 2H, H_{5'}), 3.99-4.02 (m, 1H, H_{4'}), 4.58-4.62 (m, 1H, H_{3'}), 6.46 (t, *J*= 6.4 Hz, 1H, H_{1'}), 8.36 (s, 1H, H₂ ou H₈), 8.66 (s, 1H, H₈ ou H₂), 9.62 (s, 1H, NH).

¹³C RMN (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : -5.53, -5.47, -4.84, -4.70 (CH₃-Si), 17.94, 18.30 (C_q^tBu), 25.60, 25.71, 25.88 (CH₃ ^tBu, NAc), 41.06 (C_{2'}), 62.69 (C_{5'}), 71.85 (C_{3'}), 84.62 (C_{1'}), 88.00 (C_{4'}), 122.22 (C₅), 141.69 (C₂ ou C₈), 149.27 (C₄ ou C₆), 150.91 (C₆ ou C₄), 152,15 (C₈ ou C₂), 170.81 (C=O).

Composé 26 : *N*⁶-Acétyl-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)-*N*⁶-[(méthoxycarbonyl)éthyl]-2'-désoxyadénosine



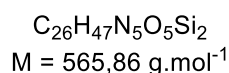
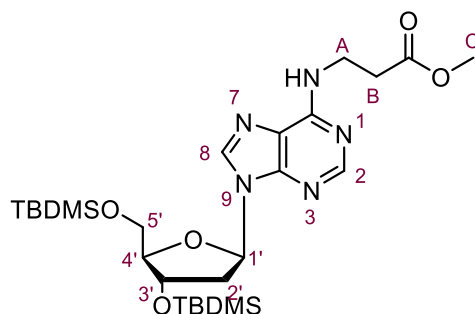
À une solution du composé **25** (5,42 g, 0,0104 mol) dans 40 mL de DMF anhydre on additionne 1,55 éq. d'acrylate de méthyle (1,39 g, 0,0162 mol) et 1,55 éq. de DBU (2,47 g, 0,0162 mol) en un goutte à goutte rapide. L'agitation est poursuivie 18 h à T.A. et la réaction arrêtée par ajout de 200 mL d'eau glacée. Après concentration sous pression réduite, le résidu est déposé sur colonne de silice (élution EP/AcOEt 1 :1) pour donner le produit **26** désiré sous forme d'une huile incolore (4,88 g, 77%).

Rf : 0,72 (20/80 éther de pétrole/AcOEt).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.08, 0.09 (2s, 6H, CH₃-Si), 0.10 (s, 6H, CH₃-Si), 0.91, 0.93 (2s, 18H, ^tBu), 2.24 (s, 3H, NAc), 2.46-2.53 (m, 1H, H_{2a}'), 2.64-2.72 (m, 1H, H_{2b}'), 2.81 (dd, *J*= 6.7, 6.9 Hz, 2H, H_B espaceur), 3.57 (s, 3H, H_C espaceur), 3.77-3.91 (2dd, *J*= 4.0, 3.0, 11.2 Hz, 2H, H₅'), 4.04-4.08 (m, 1H, H₄'), 4.44 (dd, H_A espaceur), 4.63-4.67 (m, 1H, H₃'), 6.54 (t, *J*= 6.4 Hz, 1H, H₁'), 8.40 (s, 1H, H₂ ou H₈), 8.77 (s, 1H, H₈ ou H₂).

¹³C RMN (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : -5.52, -5.43, -4.82, -4.68 (CH₃-Si), 17.97, 18.37 (Cq ^tBu), 24.13 (N-Ac), 25.72, 25.91 (CH₃ ^tBu), 33.25 (CH₂-B espaceur), 41.23 (C₂'), 43.75 (CH₂-A espaceur), 51.50 (CH₃-C espaceur), 62.68 (C₅'), 71.86 (C₃'), 84.58 (C₁'), 88.09 (C₄'), 127.26 (C₅), 142.61 (C₂ ou C₈), 151.78 (C₈ ou C₂), 152.62 (C₄ ou C₆), 153.24 (C₆ ou C₄), 171.29 (C=O espaceur), 172.00 (NC(O)Me).

Composé 27 : 3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-N⁶-[(méthoxycarbonyl)éthyl]-2'-désoxyadénosine



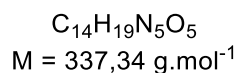
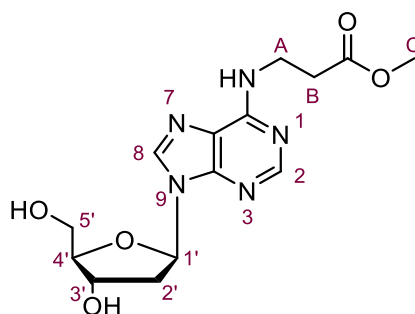
À une solution du composé **26** (0,645 g, 1,06 mmol) dans 15 mL d'acétonitrile anhydre, on ajoute 12 mL d'une solution d'ammoniac 7M dans le méthanol. Après 24 h d'agitation à T.A., l'ensemble est concentré sous pression réduite. Le résidu est noyé dans l'eau puis extrait à l'acétate d'éthyle et les phases organiques sont rassemblées et lavées à l'eau salée. Après séchage (Na_2SO_4) et concentration sous pression réduite, le résidu est chromatographié sur colonne de silice (dépôt solide, DCM/MeOH 99:1) pour donner le composé **27** sous la forme d'une huile incolore (0,478 g, 79%).

Rf : 0,36 (96/4 DCM/MeOH).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.01 (s, 6H, CH₃-Si), 0.03 (s, 6H, CH₃-Si), 0.83, 0.84 (2s, 18H, ^tBu), 2.31-2.39 (m, 1H, H_{2a}'), 2.56-2.62 (m, 1H, H_{2'b}'), 2.66 (dd, *J*= 6.2 Hz, 2H, H_B espaceur), 3.59 (s, 3H, H_C espaceur), 3.67-3.82 (2dd, *J*= 4.4, 3.4, 11.1 Hz, 2H, H_{5'}'), 3.88 (br s, 2H, H_A espaceur), 3.92-3.96 (m, 1H, H_{4'}'), 4.53-4.57 (m, 1H, H_{3'}'), 6.37 (t, *J*= 6.4 Hz, 1H, H_{1'}'), 8.04 (s, 1H, H₂ ou H₈), 8.29 (s, 1H, H₈ ou H₂).

¹³C RMN (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : -5.58, -5.50, -4.90, -4.76 (CH₃-Si), 17.90, 18.30 (C_q ^tBu), 25.67, 25.86 (CH₃ ^tBu), 34.10 (CH₂-B espaceur), 36.23 (CH₂-A espaceur), 40.96 (C_{2'}), 51.61 (CH₂-C espaceur), 62.70 (C_{5'}), 71.84 (C_{3'}), 84.17 (C_{1'}), 87.70 (C_{4'}), 120.08 (C₅), 138.34 (C₂ ou C₈), 152.86 (C₈ ou C₂), 154.53 (C₄, C₆), 172.46 (C=O espaceur).

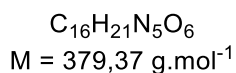
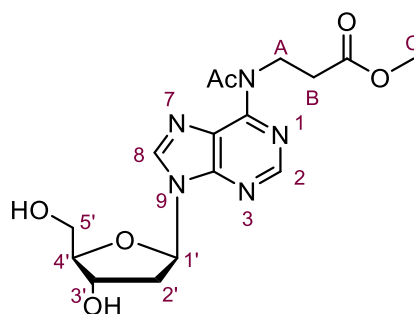
Composé 28 : N⁶-[(méthoxycarbonyl)éthyl]-2'-désoxyadénosine



À une solution du composé **27** (0,5 g, 8,8 mmol) dans 30 mL de THF anhydre, on additionne 2,2 éq. d'une solution de TBAF 1M (1,76 mL, 1,76 mmol) dans le THF à T.A. Au bout de 30 min d'agitation environ et disparition du produit de départ vérifiée par CCM (DCM/MeOH 9 : 1) on ajoute 20 mL d'eau. L'ensemble est concentré sous pression réduite puis on ajoute 20 mL d'acétate d'éthyle au résidu aqueux, avant décantation et extraction à l'acétate d'éthyle (2x20 mL). Après séchage (Na₂SO₄) et concentration sous pression réduite, l'huile résultante est chromatographiée sur colonne de silice (DCM/MeOH, 95:5). On récupère 220 mg d'huile incolore, mélange du produit désiré **28** et de résidus de TBAF.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2.36-2.43 (m, 1H, H_{2'a}), 2.73 (t, *J*=6.1 Hz, 2H, H_B espaceur), 2.94-3.03 (m, 1H, H_{2'b}), 3.69 (s, 3H, H_C espaceur), 3.79-3.97 (m, 3H, H_A espaceur, H_{5'}), 4.24 (s, 1H, H_{4'}), 4.76-4.78 (m, 1H, H_{3'}), 6.40 (dd, *J*= 8.7, 5.6 Hz, 1H, H_{1'}), 6.55 (s large, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, H₂ ou H₈), 8.30 (s, 1H, H₈ ou H₂).

Composé 29 : N⁶-Acétyl- N⁶-[(méthoxycarbonyl)éthyl]-2'-désoxyadénosine



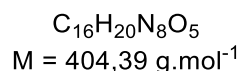
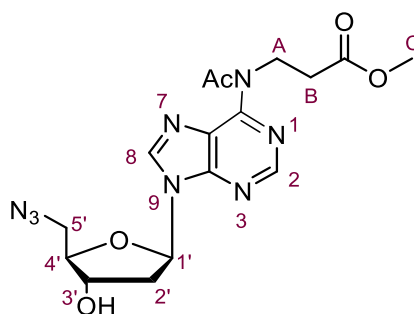
À une solution du composé **26** (2,35 g, 3,86 mmol) dans 15 mL de THF anhydre, on additionne 8,5 mL (8,50 mmol) de solution 1M de TBAF dans le THF à 0°C. Après une heure d'agitation, on laisse l'ensemble revenir à température ambiante. Un suivi par CCM (AcOEt/éther de pétrole 8:2) indique la disparition du composé de départ après 2 h d'agitation. Après concentration sous pression réduite, le résidu est directement chromatographié sur colonne de silice (AcOEt/MeOH 97:3) pour donner le produit **29** sous la forme d'une huile incolore qui se solidifie (mousse blanche) sous rampe à vide (1,34 g, 91%).

Rf : 0,43 (90/10 AcOEt/MeOH).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2,28 (s, 3H, N-Ac), 2,40-2,47 (m, 1H, H_{2a}'), 2,81 (t, J=7.2 Hz, 2H, H_B espaceur), 3,01-3,11 (m, 1H, H_{2b}'), 3,58 (s, 3H, H_C espaceur), 3,83-4,02 (m, 2H, H₅'), 4,26 (s, 1H, H₄'), 4,45 (t, J= 7.2 Hz, 2H, H_A espaceur), 4,80-4,81 (m, 1H, H₃'), 6,47 (dd, J= 9.0, 5.6 Hz, 1H, H₁'), 8,27 (s, 1H, H₂ ou H₈), 8,77 (s, 1H, H₈ ou H₂).

¹³C RMN (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 24.13 (N-Ac), 33.31 (CH₂-B espaceur), 40.79 (C₂'), 43.87 (CH₂-A espaceur), 51.70 (CH₂-C espaceur), 63.21 (C₅'), 72.87 (C₃'), 87.48 (C₁'), 89.38 (C₄'), 128.22 (C₅), 143.72 (C₂ ou C₈), 151.30 (C₈ ou C₂), 151.94 (C₄ ou C₆), 153.93 (C₆ ou C₄), 171.64 et 172.10 (C=O).

Composé 30 : 5'-Azido-*N*⁶-acetyl-*N*⁶-[(methoxycarbonyl)ethyl]-2',5'-dideoxyadenosine



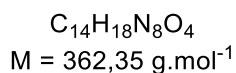
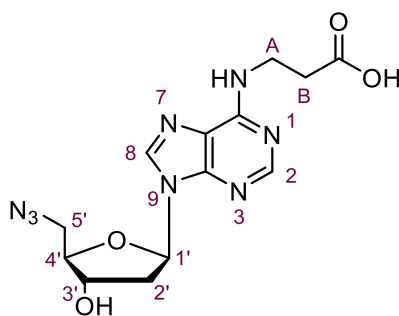
À une solution du composé **29** (1,06 g, 2,79 mmol) dans 30 mL de DMF anhydre, on ajoute 1,2 éq. de triphénylphosphine (0,88 g, 3,35 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 15 min à T.A., avant l'ajout de 5 éq. d'azoture de sodium (0,91 g, 14,00 mmol) suivi après 15 min par 1,2 éq. de tétrabromure de carbone (1,11 g, 3,35 mmol). La suspension résultante prend une teinte jaune et chauffe modérément. Après 12 h d'agitation on verse lentement 60 mL d'une solution aqueuse à 5% d'hydrogénocarbonate de sodium au mélange réactionnel et l'agitation est poursuivie pendant 30 min. Après extraction au dichlorométhane, l'ensemble des phases organiques est séché (Na_2SO_4) puis concentré sous pression réduite. Le résidu est déposé sur colonne de silice (DCM/MeOH 99:1 puis 97:3 après élution de tout l'oxyde de triphénylphosphine) et le produit **30** recueilli sous la forme d'un semi solide blanc (0,79 g, 69%).

Rf : 0,50 (90/10 DCM/MeOH).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 2.22 (s, 3H, N-Ac), 2.57-2.65 (m, 1H, $\text{H}_{2'a}$), 2.78 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, H_B espaceur), 2.92-3.01 (m, 1H, $\text{H}_{2'b}$), 3.54 (s, 3H, H_C espaceur), 3.61-3.72 (m, 2H, $\text{H}_{5'}$), 4.17-4.22 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 4.40 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, H_A espaceur), 4.69-4.73 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 6.55 (t, $J=6.5$, 1H, $\text{H}_{1'}$), 8.38 (s, 1H, H_2 ou H_8), 8.79 (s, 1H, H_8 ou H_2).

^{13}C RMN (75.46 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 24.13 (N-Ac), 33.29 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-B}$ espaceur), 39.83 (C_2), 43.84 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-A}$ espaceur), 51.67 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-C}$ espaceur), 52.05(C_5), 71.81 (C_3), 84.59 (C_1), 85.38 (C_4), 127,51 (C_5), 142.95 (C_2 ou C_8), 151.97 (C_8 ou C_2), 152.69 (C_4 ou C_6), 153.27 (C_6 ou C_4), 171.70 et 172.10 (C=O).

Composé 31' : Acide 3-(5'-azido-2',5'-didésoxyadénosin-*N*⁶-yle)propanoïque



À une solution de **30** (0,790 g, 1,95 mmol) dans 15 mL de méthanol anhydre, on ajoute 15 mL d'une solution d'ammoniac 7M dans le méthanol. Après 48 h d'agitation à T.A. l'ensemble a été concentré sous pression réduite puis chromatographié sur colonne de silice (DCM/MeOH 96:4 jusqu'à 90:10) pour donner le composé **31** sous la forme d'une huile incolore (0,5 g 73%).

Rf : 0,35 (90/10 DCM/MeOH).

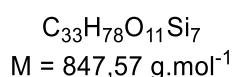
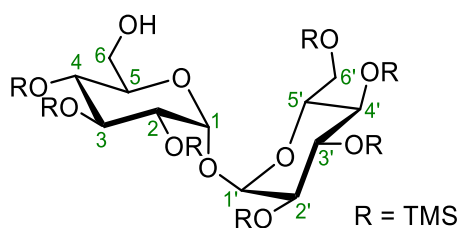
¹H RMN (300 MHz, MeOD) δ (ppm) : 2.44-2.53 (m, 1H, H_{2'a}), 2.63 (dd, *J*= 5.7 Hz, 2H, H_B espaceur), 2.88-2.97 (m, 1H, H_{2'b}), 3.55-3.67 (m, 2H, H_{5'}), 3.89 (br s, 2H, H_A espaceur), 4.07-4.11 (m, 1H, H_{4'}), 4.55-4.59 (m, 1H, H_{3'}), 6.44 (t, *J*= 6.6 Hz, 1H, H_{1'}), 8.25 (s, 1H, H₂ ou H₈), 8.27 (s, 1H, H₈ ou H₂).

¹³C RMN (75.46 MHz, MeOD) δ (ppm) : 34.72 (CH₂-B espaceur), 36.63 (CH₂-A espaceur), 38.84 (C_{2'}), 51.86 (C_{5'}), 71.44 (C_{3'}), 84.19 (C_{1'}), 85.73 (C_{4'}), 139.22 (C₂ ou C₈), 152.46 (C₈ ou C₂), 175.23 (C=O espaceur), C₄, C₅, C₆ non détectés.

HRMS (ESI) [M+H⁺] : calculée = 348,12945, trouvée = 348,15256.

3- Synthèse de dérivés tréhalose

Composé 12 : 2,3,4,2',3',4',6'-Hepta-*O*-triméthylsilyl- α,α' -D-tréhalose



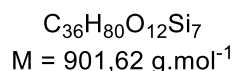
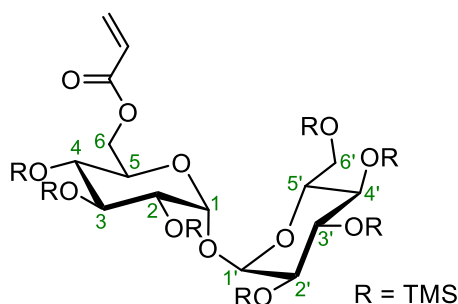
À une solution de tréhalose per-triméthylsilylé [202] (4,95 g, 5,38 mmol) dans 300 mL de méthanol sous agitation soutenue on additionne à 0°C 0,9 éq. de carbonate de potassium finement divisé au moyen d'un mortier (0,70 g, 5,10 mmol). Au bout de 15 minutes, l'ensemble est noyé dans 300 mL de pentane puis lavé avec 2x150 mL d'eau. La phase organique est séchée (Na₂SO₄) puis concentrée sous pression réduite avant d'être chromatographiée sur colonne de silice (élution EP/AcOEt 99:1 jusqu'à 96:4). Le produit isolé est ensuite séché sous rampe à vide pour donner le tréhalose-TMS₇ **12** sous forme d'un solide blanc (1,48g, 32%).

Rf : 0,86 (80/20 éther de pétrole/AcOEt).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.11 (s, 63H, CH₃-Si), 0.13 (s, 63H, CH₃-Si), 0.14 (s, 63H, CH₃-Si), 0.16 (s, 63H, CH₃-Si), 0.17 (s, 63H, CH₃-Si), 1.82 (s large, 1H, OH), 3.39-3.51 (m, 4H, H₂, H_{2'}, H₄ et H_{4'}), 3.64-3.74 (m, 4H, H₆ et H_{6'}), 3.78-3.86 (m, 4H, H₅ et H_{5'}), 3.88-3.94 (2dd, *J*= 9.0, 8.9 Hz, 4H, H₃ et H_{3'}), 4.90 (d, 1H, *J*= 3.1 Hz, H₁ ou H_{1'}), 4.95 (dd, *J*= 3.1 Hz, 1H, H_{1'} ou H₁).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : -0.32 (CH₃-Si), 0.05 (CH₃-Si), 0.82 (CH₃-Si), 0.88, 0.98 (CH₃-Si), 1.01 (CH₃-Si), 61.52 (C₆), 62.08 (C_{6'}), 71.37 (C₂ et C_{2'}), 71.65 (C₄ et C_{4'}), 72.76 (C₅), 72.78 (C_{5'}), 73.39 (C₃), 73.45 (C_{3'}), 94.40 (C₁), 94.24 (C_{1'}).

Composé 14 : 6-O-Acryloyl-2,3,4,2',3',4',6'-hepta-O-triméthylsilyl- α,α' -D-tréhalose



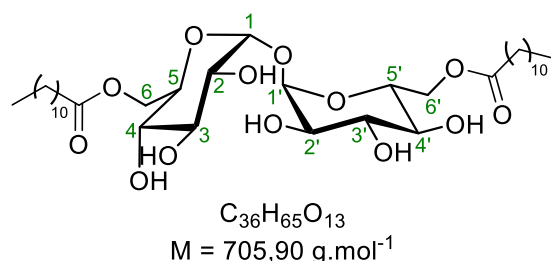
À une solution de tréhalose-TMS₇ **12** (0,84 g, 1 mmol) dans 5 ml de DCM anhydre, on ajoute 2,2 éq. de triéthylamine (0.3 mL, 2,2 mmol). L'ensemble est agité et refroidi à 0°C avant l'addition goutte à goutte de 1,5 éq. de chlorure d'acryloyle (120 µL, 1,5 mmol), et on laisse l'ensemble revenir à T.A.. Après 2 h d'agitation, la suspension orange obtenue est diluée avec 20 mL de DCM et cette phase organique est lavée à l'eau salée (2x30 mL) puis à l'eau (50 mL) avant séchage (Na₂SO₄). Après concentration sous pression réduite, le résidu est chromatographié sur colonne de silice (éther de pétrole/AcOEt 99:1) pour donner le produit **14** sous forme d'une huile incolore (534 mg, 59%).

Rf : 0,65 (90/10 éther de pétrole/AcOEt).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.09, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16 (5s, 63H, CH₃-Si), 3.40-3.56 (m, 4H, H₂, H_{2'}, H₄ et H_{4'}), 3.68-3.69 (m, 2H, H₆), 3.76-3.81 (m, 2H, H₅), 3.87-3.96 (dd, *J* = 8.6, 17.6 Hz, 4H, H₃ et H_{3'}), 4.04-4.10 (m, 1H, H₅), 4.15-4.21 (dd, *J* = 4.3, 12.0 Hz, 1H, H₆), 4.37-4.41 (dd, *J* = 2.2, 12.0 Hz, 1H, H_{6'}), 4.91 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, H₁ ou H_{1'}), 4.96 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, H_{1'} ou H₁), 5.85 (dd, 1H, *J* = 1.5, 10.3 Hz, CH=CH₂ *cis*), 6.18 (dd, 1H, *J* = 10.3, 17.3 Hz, CH=CH₂ *trans*), 6.45 (dd, 1H, *J* = 1.5, 17.3 Hz, CH=CH₂ *gem*).

¹³C RMN (75.46 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : -0.30 (CH₃-Si), 0.12 (CH₃-Si), 0.17 (CH₃-Si), 0.85 (CH₃-Si), 0.89 (CH₃-Si), 1.04 (CH₃-Si), 61.92 (C₆), 63.64 (C_{6'}), 70.55 (C₂), 71.53 (C_{2'}), 71.94, 72.65 (C₃), 72.78 (C_{3'}), 73.36 (C₄), 73.46 (C_{4'}), 73.55 (C₅), 73.56 (C_{5'}), 94.20 (C₁), 94.50 (C_{1'}), 128.12 (=CH), 131.12 (=CH₂), 166.11 (C=O).

Composé 23 : 6,6'-Bis-O-dodécanoyl- α,α' -D-tréhalose



À une solution d'acide laurique (0,104 g, 0,52 mmol, 2 éq.) dans du DCM anhydre (3 mL) on ajoute successivement le composé **7** (0,200 g, 0,26 mmol), 2 éq. de DCC (0,106 g, 0,52 mmol) et 0,5 éq. de DMAP (0,016 g, 0,13 mmol). Le mélange est agité pendant une nuit à T.A. jusqu'à l'achèvement de la réaction. Le précipité est filtré et lavé au DCM puis le filtrat est concentré à sec sous vide. Le brut résultant est chromatographié sur gel de silice (éther de pétrole/EtOAc, 75:25) pour obtenir le composé **8'** attendu sous forme d'une poudre blanche (0,254 mg, 86 %). À une solution de **23'** (0,254 g, 0,22 mmol) dans 40 mL de méthanol on ajoute 0,7 g de résine échangeuse Dowex 50WX2-100. Le mélange est agité pendant 15 minutes à température ambiante jusqu'à l'achèvement de la réaction. Il est ensuite filtré et le filtrat est évaporé sous vide. Le composé **23** (0,143 g, 91% brut) s'est avéré suffisamment propre après séchage pour ne pas nécessiter de chromatographie.

Rf: 0,49 (75/25 éther de pétrole /AcOEt).

^1H RMN (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 0.70-0.82 (m, 3H, CH₃ lipide), 1.03-1.25 (m, 32H, CH₂ lipide), 1.28-1.42 (m, 4H, CH₂-CH₃ lipide), 3.15-3.26 (m, 4H, CH₂-C=O lipide), 3.50 (dd, 2H, $J = 3.1 \text{ Hz}, 9.2 \text{ Hz}, H_2, H_2'$), 3.49-3.58 (m, 2H, H₄, H_{4'}), 3.63-3.70 (m, 4H, H₆, H_{6'}), 3.83-3.90 (m, 2H, H₃, H_{3'}), 3.92-4.02 (m, 2H, H₅, H_{5'}), 4.96 (d, 2H, H₁, H_{1'}).

^{13}C RMN (75.46 MHz, MeOD) δ (ppm): 13.8 (CH₃ lipide), 20.5 (CH₂ lipide), 24.7 (CH₂ lipide), 30.1 (CH₂ lipide), 30.5 (CH₂ lipide), 30.6 (CH₂ lipide), 30.6 (CH₂ lipide), 30.9 (CH₂ lipide), 30.9 (CH₂-CH₃ lipide), 31.1 (CH₂ lipide), 31.5 (CH₂ lipide), 61.7, 61.8 (C₆, C_{6'}), 71.3, 72.5, 74.4 (C₂, C_{2'}, C₃, C_{3'}, C₄, C_{4'}), 74.9 (C₅, C_{5'}), 95.5 (C₁, C_{1'}).

Chapitre VIII- Formulation et physico-chimie

Procédure générale de formulation des NPs et SLNs

Le PLGA Resomer[®] RG 503H (Sigma-Aldrich, 719870) a été utilisé avec un rapport lactide/glycoside de 50:50 (%), masse moléculaire de 24000 à 38000 g.mol⁻¹. Le protocole de nanopréciipitation a été adapté d'une précédente étude pour l'obtention des suspensions de NPs [136]. En résumé, 31 mg de PLGA Resomer[®] RG 503H (Sigma-Aldrich, 719870) ont été dissous dans 3,1 ml de tétrahydrofurane (THF, Sigma-Aldrich, 401757). 200 µl de cette solution mère ont été rapidement ajoutés au goutte à goutte à 20 ml d'eau déionisée sous sonication (37Hz, 100%, 3 min). La suspension de NPs obtenue a ensuite été lentement concentrée (concentration typique ~ 0,2 mg.ml⁻¹) par ultracentrifugation (Amicon Ultra, pores de 10 kDa, Merck Millipore) pendant 21 min à 5 000 rpm (Centrifugeuse 5804 R, Eppendorf). Le protocole de *rapid mixing* a été adapté de la littérature [242] pour préparer les suspensions de NPs. 500 µL de la solution mère de PLGA ont été injectée (3 ml.min⁻¹) simultanément avec 1,5 ml d'eau déionisée (9 ml.min⁻¹) par un système de pompes à seringue (kdScientific, États-Unis). La suspension de NPs de PLGA a ensuite été lentement concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à une concentration de 2,5 mg.ml⁻¹. Comme condition de contrôle, des NPs de PLGA contenant du *Nile Red* (Sigma-Aldrich, 19123) ont été obtenues de manière similaire, à l'exception de l'introduction de 0,9 mg de *Nile Red* dans la solution mère de polymères. **F2** et **F3** ont été formulées de manière similaire, hormis que 15 % (m/m) de **dATr** ou **GNL** ont été introduits dans la solution mère de PLGA. Dans le cas des SLNs (**F4**), leur formulation par *rapid mixing* a été obtenue par l'injection simultanée de 500 µL d'une solution de **GNL** dans le THF (solution mère : 4,11 x 10⁻⁶ mol de **GNL** dans 3,1 ml de THF) et d'eau déionisée (1,5 ml). Pour toutes les expériences, les formulations de NPs et les SLNs ont été préparées extemporanément.

Calcul théorique des valeurs de balance Hydrophile-Lipophile

Les valeurs de balance Hydrophile-Lipophile (HLB) des différentes molécules (tréhalose, **GNL** et **dATr**) ont été calculées en utilisant le logiciel ChemAxon Marvin View (version 18.24.0, ChemAxon, 2018) [243]. Les molécules ont d'abord été dessinées avant d'utiliser le *plug-in* de prédiction de la HLB [244]. Avec ce dernier, les trois options de calcul ont été testées : Davies [245], Griffin [246] et ChemAxon. La méthode de Davies prend en

compte les différents groupes structurels hydrophiles ou lipophiles de la molécule étudiée pour calculer le HLB, en utilisant la formule suivante :

$$HLB = 7 + \sum HLB \text{ des groupes hydrophiles} + \sum HLB \text{ des groupes lipophiles.}$$

En fonction de la valeur obtenue, un caractère hydrophile ($HLB > 10$) ou un caractère plutôt hydrophobe ($HLB < 6$) peuvent être mis en évidence. Dans le cas de la méthode de Griffin, l'échelle de HLB varie entre 0 et 20 et représente le ratio entre les parties polaire et non polaire de la molécule. Enfin, la méthode de ChemAxon résulte d'un consensus entre les 2 précédentes méthodes. Quelle que soit la méthode utilisée, plus la valeur de la HLB est élevée et plus la molécule est hydrophile et sa solubilité en milieu aqueux importante. Les valeurs présentées dans ce manuscrit seront celles obtenues par la méthode dite de consensus de ChemAxon.

Caractérisations physico-chimiques des NPs et SLNs, et évaluation de leur stabilité colloïdale

L'analyse granulométrique des NPs et SLNs a été effectuée par diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering DLS*) en utilisant un *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments, Royaume-Uni). Les suspensions de NPs et SLNs ont été diluées au 1:1000 (v/v) avant analyse de taille et de l'indice de polydispersité (PDI) à 25°C en triplicat. Pour ce qui est de la détermination du potentiel zêta, les mêmes dilutions ont été placées dans des cellules à capillaire replié (DTS1060) avant analyse par le *Zetasizer Nano ZS*. L'évaluation à court terme (1 mois) de la stabilité colloïdale des différentes formulations a été effectuée en suivant plusieurs paramètres : i) absence visuelle de crémage ou séparation de phase, ii) taille et iii) potentiel zêta. La caractérisation structurale par microscopie électronique à transmission (TEM) a été réalisée en utilisant un Hitachi H7650 (Tokyo, Japon) couplé à une caméra ORIUS SC1000 11MPX (Gatan, États-Unis). Tous les échantillons ont été déposés sur des grilles avec un film carbone (Delta Microscopies, France) avec un temps de contact de 3 min. Le contraste a été effectué soit par du nanotungstène soit par de l'uranyless.

Quantification du GNL libre par un test enzymatique

La quantification du GNL libre dans les suspensions de NPs chargées en dérivé de tréhalose a été effectuée en utilisant la procédure de dosage sur microplaque de Megazyme

(*Trehalose Assay Kit*, Megazyme, Ireland) [247]. Brièvement, des solutions standards en tréhalose (concentration entre 25 et 100 μM) ont été préparées et 20 μl de chacune ont ensuite été utilisées pour la courbe d'étalonnage. À ces 20 μl ont été ajoutés 200 μl d'eau déionisée, 20 μl de la solution **1** (tampon), 10 μl de la solution **2** (celle-ci contient à la fois du NADP^+ et de l'adénosine 5' triphosphate) et 2 μl de la solution **3** (solution contenant deux des enzymes nécessaires à ce test : l'hexokinase et le glucose-6-phosphate déshydrogénase). Les solutions ont ensuite été mélangées et leur absorbance a été mesurée à 340 nm (abs_0) avant addition dans le milieu de la tréhalase. Pour l'étape suivante on additionne dans les puits de 2 μL la suspension **4** contenant la tréhalase. La plaque 96 puits a ensuite été agitée et incubée 8 min à température ambiante avant de mesurer à nouveau l'absorbance des différentes solutions à 340 nm (abs_1). La courbe d'étalonnage a donc été obtenue en représentant l'absorbance corrigée par le bruit de fond ($\text{abs}_1 - \text{abs}_0$) en fonction de la concentration en tréhalose. Pour les quantifications des échantillons de NPs, le même protocole a été utilisé à l'exception de l'utilisation directe de 220 μl de suspension au lieu des 20 μl de standard et 200 μl d'eau déionisée. Cette modification a été nécessaire pour s'assurer que les absorbances mesurées soient incluses dans la gamme d'étalonnage utilisée.

Détermination de l'efficacité d'encapsulation et du taux d'encapsulation

Pour estimer l'efficacité d'encapsulation (EE : *encapsulation efficiency*) et le taux d'encapsulation (DL : *drug loading*) des NPs de PLGA, la quantification du **GNL** a été obtenue par spectroscopie UV-Vis (Jasco V-630, France) et par l'intermédiaire d'une courbe d'étalonnage de ce dernier dans le méthanol (concentration de 5 à 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, absorbance à 266,5 nm). Celle-ci a été caractérisée par l'équation suivante : $y = 0,0088x + 0,1572$ (**1**), où y correspond à l'absorbance et x la concentration en **GNL** ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), et un coefficient de détermination r^2 de 0,9993. La quantité de **GNL** encapsulée dans les NPs de PLGA (*i.e.* DL) a été calculée en prenant en compte la masse de NPs chargées en **GNL** en utilisant l'équation suivante :

$$\text{DL} = \frac{\text{Quantité de GNL encapsulé}}{\text{Quantité de NPs chargées en GNL}} \times 100 \quad (\mathbf{2})$$

L'efficacité d'encapsulation (EE) en **GNL** a été définie comme le rapport entre la masse de **GNL** encapsulé et la masse de **GNL** utilisé pour la préparation des NPs en utilisant l'équation suivante :

$$EE = \frac{\text{Quantité de GNL encapsulé}}{\text{Quantité de GNL utilisé pour la formulation des NPs}} \times 100 \text{ (3)}$$

Analyses en spectroscopie InfraRouge

Les spectres infrarouges du PLGA, du **GNL**, de **F1** et **F3** ont été acquis avec un spectromètre FT-IR (FT-IR 4600, Jasco Inc., Japon) contrôlé par le logiciel *spectra manager*. Les échantillons (≈ 3 mg) ont été mélangés avec 300 mg de poudre de KBr, puis comprimés avec une pastilleuse pour obtenir des pastilles translucides. Tous les spectres ont été enregistrés après avoir fait la moyenne de 16 accumulations avec une résolution de 8 cm^{-1} entre 4000 cm^{-1} et 450 cm^{-1} . Le blanc a été effectué sur l'air et soustrait à toutes les acquisitions. Tous les spectres ont été acquis en mode transmittance. Les données IR ont été traitées par le logiciel *spectra manager* à la fois pour les spectres et leur dérivée première (Savitzky-Golay : dérivée d'ordre 1, polynôme d'ordre 2 et fenêtre de 7 points).

Chapitre IX- Évaluation biologique

Culture cellulaire et test de viabilité cellulaire

Les lignées cellulaires BE (2)-M17 (neuroblastome humain) ont été obtenues auprès de l'ATCC (CRL-2267) et cultivées dans du milieu OPTIMEM (Life Technologies, 31985-047) en ajoutant 10% de sérum bovin fœtal (Sigma-Aldrich) et 1% de pénicilline/streptomycine. Pour toutes les expériences, les suspensions de NPs et de SLNs ont été utilisées fraîchement préparées et les cellules ont été cultivées à une confluence de 70% à 80%. Les cellules ont été traitées pendant 24h ou 48h avec 0,5 µl de NPs et SLNs. Chaque expérience a été reproduite au moins trois fois. La viabilité cellulaire a été estimée par le test MTS (ATCC/LGC Promochem) en suivant les instructions du fabricant.

Immunocoloration et imagerie

Pour toutes les expériences, les suspensions de NPs ont été utilisées fraîchement préparées. Pour les essais d'internalisation et de colocalisation avec les lysosomes, des NPs chargées de Nile Red ont été utilisées. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits (NUNC) avec des lamelles. Les cellules BE (2)-M17 ont été cultivées à une confluence de 70 à 80 % par puits. Une fois les cellules fixées, elles ont été exposées à 1 µl de NPs pendant 24h à 37°C. Les cellules ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 20 minutes à 4°C puis lavées avec du PBS. Les étapes de perméabilisation et de blocage des cellules ont été réalisées par l'ajout d'un mélange composé de 5 ml de PBS, 450 µL de sérum de chèvre normal et 225 µL de triton. Les lysosomes ont été marqués avec l'anticorps LAMP-2 (Mx, H4B4) pendant une nuit à 4°C et la coloration a été révélée avec l'anticorps secondaire approprié conjugué au GAM 488 (Life Technologies). Pour la coloration du cytoplasme et des noyaux, les cellules ont été incubées pendant 8 minutes à température ambiante avec 8µM de colorant Hoechst (ThermoFisher Scientific, #3342) avant le montage sur des lamelles #1.5 avec le milieu de montage fluorescent Dako et laissées à sécher pendant la nuit dans l'obscurité. Les images (taille des pixels ~100 nm, pas z de 0,3 µm) ont été acquises sur un microscope confocal à balayage laser Leica TCS SP8 (Leica Microsystems) en utilisant un objectif à immersion d'huile Plan Apo CS 63X. Le Nile Red a été détecté en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 568 nm (laser DPSS) et une fenêtre de détection entre 570 et 590 nm. Les lysosomes ont été

détectés en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 488 nm (laser à l'argon) et une fenêtre de détection entre 545 et 605 nm. Les cellules sans traitement aux NPs ont été utilisées en parallèle comme contrôles d'autofluorescence en utilisant les longueurs d'onde d'excitation et de détection correspondantes. Les images ont été analysées avec le logiciel d'acquisition LAS AF v2.6 équipé du module HCS-A (Leica Microsystems). L'intensité du Nile Red par rapport à la surface cellulaire a été quantifiée avec le logiciel Definiens XD Developer v2.5 (Definiens). La colocalisation, les profils de fluorescence, les projections orthogonales et les projections d'intensité maximale ont été obtenus avec le logiciel Fiji/ImageJ (NIH).

Analyses par Western Blot

Les cellules BE (2)-M17 ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits (NUNC) et cultivées à une confluence de 70 à 80 % par puits avant d'être traitées avec F1, F2, F3 et F4. Les cellules sont ensuite transférées dans des Eppendorf avant centrifugation pendant 5 min. à 3000 rpm à 4°C. Le surnageant est retiré avant l'ajout au goutte à goutte au vortex de 50 µL d'une solution de P/X (P/X = 1,5 ml de RB1X, 0,450 ml de P4X, 0,050 ml de DTT). Les échantillons sont ensuite incubés 5 min à 100°C. Les échantillons protéiques sont chargés dans des gels acrylamide de 18% et séparés par SDSPAGE avant un transfert sur une membrane de nitrocellulose (0,2µm – Biorad – USA). Les membranes sont ensuite bloquées dans un tampon PBS-lait 5% avant une incubation sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire *rabbit* anti-LC3 (1/1000°, Novus Biological, #NB100-2220). Une incubation avec un anticorps *mouse* anti-actine (1/5000°, Sigma) sert de contrôle de charge. Les anticorps secondaires adéquats couplés sont ensuite utilisés avant une révélation à l'aide du kit de révélation (Super Signal West Pico Chemiluminescent kit - Immobilon Western, Chemiluminescent HRP substrate, Millipore). La chimioluminescence des images est acquise à l'aide d'un système d'analyse ChemiDoc+XRS (BioRad). Le signal par puit est quantifié à l'aide du logiciel ImageJ et normalisé par l'actine avant une analyse statistique.

Transfection avec la sonde mGFP-LC3

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 12 puits (NUNC) avec des lamelles. Les cellules BE (2)-M17 ont été cultivées à une confluence de 70 à 80 % par puits puis transfectées avec le plasmide GFP-LC3 à 1,6 µg d'ADN en utilisant la transfection médiée par PEI. Les cellules ont été maintenues pendant 24 heures à 37°C dans 5% de CO₂ avant d'être

traitées avec à 0,5 µl de NPs ou de SLNs pendant 24 heures. Les lamelles de cellules ont été fixées à 4°C pendant 20 minutes au paraformaldéhyde à 4%. Les cellules fixées ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X pendant 5 minutes à chaque fois. Les lamelles de cellules ont finalement été colorées avec une solution de DAPI (Invitrogen) à 10 µM pendant 8 minutes avant de longs lavages dans du PBS 1X. Les lamelles ont été montées sur des lames à l'aide d'une solution de montage (Dako), et les acquisitions d'images ont été réalisées sur un microscope à épifluorescence Olympus à grand champ (BX3-CBH) couplé à une caméra Hamamatsu (ORCA-Flash 4.0 LT). Les images ont été déconvoluées à l'aide du logiciel cellSens Dimension. L'analyse des images a été effectuée dans FIJI/ImageJ. Pour l'analyse de GFP, les cellules ont été segmentées par sélection manuelle des cellules. Le masque a ensuite été appliqué au canal GFP, où la coloration verte a été quantifiée par seuillage automatique suivi d'une binarisation. La coloration totale a été normalisée par cellule, et un minimum de 20 cellules a été analysé pour chaque condition.

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 6. Pour les essais fonctionnels, la signification statistique des données a été évaluée par la méthode de calcul *one-way* analyses of variance (ANOVA) suivie du test de comparaison multiple de Tukey. Le niveau de signification a été fixé à $p < 0,05$.

ANNEXES

Revue – *PLGA-Based Nanoparticles for Drug Delivery in Neurodegenerative Diseases*

Résumé en français :

Le traitement des maladies neurodégénératives est devenu l'un des sujets les plus importants de ces dernières décennies en raison de leur prévalence et de leur coût sociétal croissant. Le point principal des stratégies thérapeutiques non invasives pour le traitement des troubles neurologiques repose sur le passage des médicaments à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, cette barrière biologique est impliquée dans l'homéostasie vasculaire cérébrale par ses jonctions serrées, par exemple. Une façon de surmonter cette limite et de délivrer des substances neuroprotectrices dans le cerveau repose sur des approches basées sur les nanotechnologies. Les nanoparticules de poly(acide lactique-co-glycolique) (NPs de PLGA) sont biocompatibles, non toxiques et offrent de nombreux avantages, notamment une meilleure solubilité des substances actives, une protection contre la digestion enzymatique, une efficacité de ciblage accrue et une meilleure internalisation cellulaire. Cette revue présentera un aperçu des dernières découvertes et avancées dans l'approche basée sur les NPs de PLGA pour l'administration de substances neuroprotectrices dans le cas du traitement de maladies neurodégénératives (telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique ...).

Review

PLGA-Based Nanoparticles for Neuroprotective Drug Delivery in Neurodegenerative Diseases

Anthony Cunha^{1,2} , Alexandra Gaubert^{1,*} , Laurent Latxague^{1,*} and Benjamin Dehay^{2,*} 

¹ Université de Bordeaux, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, ARNA, ARN: Régulations Naturelle et Artificielle, ChemBioPharm, 146 rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux, France; anthony.cunha@u-bordeaux.fr

² Univ. Bordeaux, CNRS, IMN, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

* Correspondence: alexandra.gaubert@u-bordeaux.fr (A.G.); laurent.latxague@u-bordeaux.fr (L.L.); benjamin.dehay@u-bordeaux.fr (B.D.)

Abstract: Treatment of neurodegenerative diseases has become one of the most challenging topics of the last decades due to their prevalence and increasing societal cost. The crucial point of the non-invasive therapeutic strategy for neurological disorder treatment relies on the drugs' passage through the blood-brain barrier (BBB). Indeed, this biological barrier is involved in cerebral vascular homeostasis by its tight junctions, for example. One way to overcome this limit and deliver neuroprotective substances in the brain relies on nanotechnology-based approaches. Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles (PLGA NPs) are biocompatible, non-toxic, and provide many benefits, including improved drug solubility, protection against enzymatic digestion, increased targeting efficiency, and enhanced cellular internalization. This review will present an overview of the latest findings and advances in the PLGA NP-based approach for neuroprotective drug delivery in the case of neurodegenerative disease treatment (i.e., Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's diseases, Amyotrophic Lateral, and Multiple Sclerosis).



Citation: Cunha, A.; Gaubert, A.; Latxague, L.; Dehay, B. PLGA-Based Nanoparticles for Neuroprotective Drug Delivery in Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1042. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071042>

Academic Editor: Oya Tagit

Received: 3 June 2021

Accepted: 6 July 2021

Published: 8 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: PLGA nanoparticles; neurodegenerative diseases; drug delivery; central nervous system; neuroprotective drugs

1. Introduction

Neurodegenerative diseases (NDD) represent a major societal issue. For example, in 2015, more than 46.8 million people worldwide were affected by dementia [1] and over 6 million by Parkinson's disease (PD) [2]. This number is increasing each year due to, in particular, the population aging. NDDs are a complex group of diseases with no curative treatments for the five most common and known of them: Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease, Huntington's disease (HD), Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), and Multiple Sclerosis (MS) (Table 1). These incurable and incapacitating diseases lead to the progressive degeneration and death of nerve cells, causing troubles related to motor disabilities or mental dysfunction (called dementias), considerably worsening patient quality of life.

Therefore, the development of chronic treatments for NDDs both effective and easy to administer remains a major challenge due to the necessary blood-brain barrier (BBB) crossing to get drugs into the brain. This barrier filters and controls the passage of foreign blood substances, potentially dangerous molecules or pathogens, and prevents them from passing freely from the blood into the extracellular fluid of the brain's gray matter. In addition, the BBB protects the brain cells by regulating their environment (cerebral vascular homeostasis, pH) against hormone and neurotransmitter variations, for example. Thus, it offers strong resistance to the ion movement, allowing to maintain the brain chemical balance and adjusting this environment to guarantee a perfect transmission of signals between neurons. In addition, the existence of tight junctions (TJs) between each

endothelial cell greatly limits the cerebral passage of numerous compounds (98% of the substances cannot cross it) [3,4].

Table 1. Non-exhaustive description of most known neurodegenerative diseases.

Disease	Prevalence (Per 100,000 Person)	Symptoms	Affected Areas
AD	511–690 [5]	Memory impairment, changes in thinking, judgment, language, behavioral changes, etc.	Cortex, hippocampus, brainstem
PD	100–200 [6]	Rest tremors, slowness of movement, decrease of spontaneous mobility, muscular stiffness, etc.	Basal ganglia, cortex
HD	5.96–13.7 [7]	Motor disorders, breathing difficulties, speech and swallowing disorders, etc.	Striatum and other basal ganglia regions
ALS	3.92–4.96 [8]	Progressive muscle paralysis, muscle atrophy, spasticity, breathing and swallowing disorders, etc.	Motor cortex, spinal cord
MS	35.87–35.95 [9]	Numbness in a limb, vision problems, electric shock sensations in a limb or the back, movement problems, etc.	Brain, spinal cord, optic nerve

One way to overcome these drawbacks relies on nanotechnologies. This approach presents various advantages such as drug protection, targeting, controlled release, or interest in NDD treatment, the BBB crossing. A wide range of pharmaceutical nanocarriers was developed, including liposomes, solid lipid nanoparticles, micelles, dendrimers, or nanoparticles (NPs) [10,11].

Thanks to their physicochemical characteristics, such as their size, biocompatibility, or low cytotoxicity, polymeric NPs represent very interesting tools for delivering neuroprotective agents for NDD treatments [12]. Indeed, their ability to cross biological barriers, their versatility (encapsulation of either hydrophilic or hydrophobic drugs), or their targeting ability (drug delivery to a specific body site decreasing the off-target toxicity) explains the increasing interest for this approach. Among the polymers used for NP formulation (natural or synthetic), the most widely used is the poly(lactic-*co*-glycolic) acid (PLGA). This polymer has a double interest in the NDD treatment for its acidifying [13], particularly for PD, and drug encapsulation properties [14].

In the following review, we propose a non-exhaustive summary of the last decade's advances in delivering neuroprotective substances via PLGA NPs for NDD treatment. A focus will be made on the existing neuroprotective drugs such as phytol, rhynchophylline, or curcumin to go to the potential new neuroprotective candidates, benefiting from the PLGA NP vectorization.

2. PLGA NPs

Nowadays, PLGA NPs are a booming topic, especially for the development of NDD treatments (more than 50 articles during the last 5 years on Scopus using "PLGA", "nanoparticles", "neurodegenerative disease" as keywords). PLGA, a commercially available synthetic copolymer obtained from lactic and glycolic acid, is approved by the US regulatory agency (Food and Drug Administration: FDA) and the European Medicine Agency (EMA). To date, not based on PLGA but poly-lactic acid (PLA), paclitaxel-loaded PEG-PLA micelles have reached the market in South Korea, India, and Indonesia (Genexol[®] PM). It is currently undergoing Phase III clinical trials for access to the EU and US markets. For the NPs, only one Phase II clinical trial based on PEG-PLGA/PLA-PEG NPs (BIND-014) for metastatic castration-resistant prostate cancer was reported [15]. However, in the case of NDDs treatment, no PLGA NPs are currently on the market or in clinical trials, but

are currently only at the preclinical stage [16]. Indeed, several pre-clinical studies based on drug loaded nano-objects are in progress, including delivery of curcumin, levodopa, cholesterol or rapamycin for AD, PD, HD and MS treatment. The advantage of the PLGA NPs approach relies on their potential for drug encapsulation, excellent biocompatibility, and biodegradability [17]. PLGA degradation by hydrolysis of its ester bonds in aqueous media releases its two constitutive monomers, which are naturally produced under physiological conditions by several metabolic pathways [18,19]. Thanks to this property, PLGA was reported as an active substance, notably for the treatment of PD since lactic acid and glycolic acid decrease lysosomal pH [13,20]. For example, studies on pathological PD models demonstrated that PLGA NPs reacidified defective lysosomes to basal level (pH 4), restored lysosomal deleterious effects, due to PD-linked mutations, and overcame lysosomal acidification impairments. The acidification also supports mitochondrial membrane potential and neuronal survival in several models related to mitochondrial dysfunctions.

2.1. PLGA NP Formulation and Optimization

These last years, a wide variety of preparation techniques for PLGA NPs were reported in the literature, i.e., single and double emulsion solvent evaporation, nanoprecipitation, coacervation and spray-drying [14,21]. The single and double emulsion solvent evaporation methods are the most frequently used: PLGA is dissolved into an organic phase emulsified with an aqueous medium containing surfactants or stabilizers prior to solvent evaporation and NP formation, corresponding to a single emulsion solvent evaporation method [22]. The single method involves a two-phase process (oil in water O/W or water in oil W/O) while three-phase are used with the double emulsion solvent method (O/W/O or W/O/W). The main drawback of these two techniques is the use of shear stress during the homogenization step leading to low protein encapsulation efficiency. To overcome this drawback, the nanoprecipitation method may be beneficial. In that case, the organic solvent containing PLGA is added dropwise to the aqueous medium, leading to NPs formation by a rapid diffusion of the miscible solvent [23]. Nevertheless, the previous methods are not the most appropriate for industrial scale-up, unlike spray drying, which transforms liquid substances (sprayed in a thin stream of heated air) into powders [14].

Depending on the process used, amphiphilic, hydrophobic, or hydrophilic drugs can be either loaded inside the NP core, trapped among the polymer chains, or adsorbed on the NP surface (leading to burst release and potential off target effects). Even though a low encapsulation efficiency characterizes PLGA NPs, in particular for hydrophilic drugs, there is room for improvement by playing with the molecular weight (i.e., the higher the molecular weight, the larger the NPs) or the poly(D,L-lactic acid) (PLA)/poly (D,L-glycolic acid) (PGA) ratio [24]. The latter parameter is directly related to the crystallinity degree and the melting point of PLGA copolymers, and drives the capacity of polymers to undergo hydrolysis. Indeed, PLA exhibiting methyl side groups is more hydrophobic than PGA, leading to a slower degradation of PLGA NPs possessing a high PLA ratio [17].

Depending on the biomedical application, other parameters must be considered for NP optimization such as particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential (ζ potential), drug loading, or encapsulation efficiency. It was reported that a diameter lower than 200 nm enables an increase of the in vivo half-life and a better membrane passage, which are crucial for biomedical applications [25,26]. If the NP diameter is essential, the size distribution, characterized by the Polydispersity Index (PDI), is just as important: the smaller the PDI, the more homogeneous the population of NPs. Values of 0.2 and below are commonly deemed acceptable in practice for biomedical applications of polymer-based NPs [27]. To ensure a moderate colloidal stability of these nano-objects, a ζ potential below -30 mV or above $+30$ mV is required to avoid coagulation or flocculation phenomena [28]. Moreover, the NP charge also impacts their biological effects: positively charged NPs increase cellular uptake and cytotoxicity in nonphagocytic cells while negatively charged NPs enhance cytotoxicity in phagocytic cells [29].

Modulation of NP functionalization enables designing NP platforms to address many issues, especially in the diagnostic, the active targeting, or the shielding fields (Figure 1) [30,31]. Regarding the diagnostic approach, probes (containing fluorescent moieties, isotopes, etc.) are introduced inside the NP or at the surface, allowing the detection by different imaging techniques: near-infrared, fluorescence, positron-emission tomography, or single-photon emission computed tomography [30]. Another aspect is proper targeting to ensure the drug delivery directly on site. Ligands such as proteins, polysaccharides, peptides, aptamers, or small molecules are promising candidates in this approach [32]. For instance, tween 80, also known as polysorbate 80, can adsorb apolipoprotein E onto PLGA NPs enabling the binding of lipoprotein receptor-related proteins (LRPs), thus facilitating the BBB crossing [33]. This hydrophilic nonionic surfactant and emulsifier is usually used at 1% (*w/v*) to stabilize aqueous formulations for parenteral administration. It is speculated that weak interactions control the formation of an adsorbed monolayer of polysorbate 80 onto the nanoparticle surface [34]. As a coating, polysorbate 80 presents some clinical advantages such as decreasing the drug dosage (therefore reducing the potential side effects) or increasing its viability. Nevertheless, liver and renal toxicity, hypersensitivity or erythema need to be monitored to ensure treatment safety [35]. About intranasal administration, the critical point relies on the residence time of the drug. This problem can be addressed by using mucoadhesive polymers, such as chitosan or specific ligands such as lectins [36]. A better binding to the nasoe epithelial surface increases the residence time and thus the drug bioavailability. The last point to consider is the shielding of the nano-objects to reduce aggregation, opsonization, phagocytosis, and immune clearance, which may otherwise decrease their circulation time and their targeting efficiency. For this purpose, NPs are coated with several molecules such as carbohydrates, proteins, or lipids, knowing that PEGylation remains the main strategy to improve drug efficiency and gene delivery [37–39].

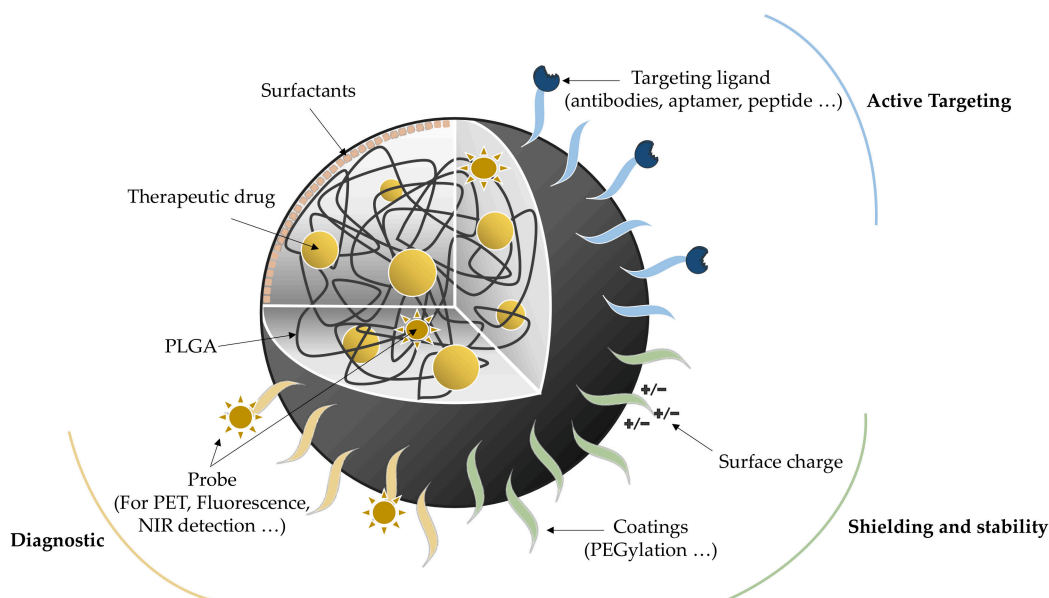


Figure 1. Schematic representation of PLGA NPs and their multiple potential functionalizations: for diagnostic, targeting, shielding, or stability purposes [30] (NIR: Near-infrared; PET: Positron-emission tomography).

2.2. Administration Routes

Due to their incredible modularity and small size, PLGA NPs present numerous advantages for NDD treatments via different available administration routes [40]. Stereotaxic surgery overpasses the BBB and thus directly delivers the drugs without peripheral drug inactivation [41]. The main advantage of this approach is to be as precise as possible on the target despite the technic invasiveness. Otherwise, other techniques such as enteral,

parental, and intranasal routes represent good alternatives. The first two require crossing the BBB through various mechanisms (simple diffusion, receptor, adsorption mediated endocytosis, or carrier-mediated transport), depending on NP functionalization, with a first pass effect decreasing the drug concentration on site in the case of enteral route [42,43]. The last one (intraneuronal absorption by a direct nose to brain delivery of the NP platforms), allows a rapid and important active substance passage into the systemic circulation without first-pass metabolism avoiding drug degradation. It offers the advantage of a better patient compliance, due to the low invasiveness of the daily-based administrations, and therefore represents a promising option for NDD treatment [44].

Two types of strategies can be considered with PLGA NPs for NDD therapy: as active substances by themselves and as cargos for neuroprotective drugs.

3. PLGA NPs for Neuroprotective Drug Delivery in Neurological Disorder Therapy

Many neuroprotective medicines cannot reach the brain due to the lack of drug-specific transport systems through the BBB. The development of new strategies based on PLGA NPs to enhance brain drug delivery is of great interest in NDD therapy [45]. Indeed, even if different pathologies are included in NDD, they all share common mechanisms such as mitochondrial or oxidative injury, neuro-inflammation, apoptosis, and protein aggregation, which contribute to neuronal loss mainly by the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway (Figure 2) [46,47]. The mitochondria complexes and mitochondrially located monoamine oxidase B (MAO-B) are involved in the nitrogen and reactive oxygen species (ROS) production. The dysfunction of these pathways is one characteristic of NDD as the neuro-inflammation for AD, PD, and MS. Neuro-inflammation is a defense mechanism that initially protects the brain by removing or inhibiting diverse pathogens. In the case of NDD, it involves abundant activated microglia inhibiting amyloid-beta ($A\beta$) phagocytosis contributing to plaque accumulation. These mechanisms are targets of choice for treating protein aggregation diseases (proteinopathies) such as AD, PD, HD, ALS, and MS.

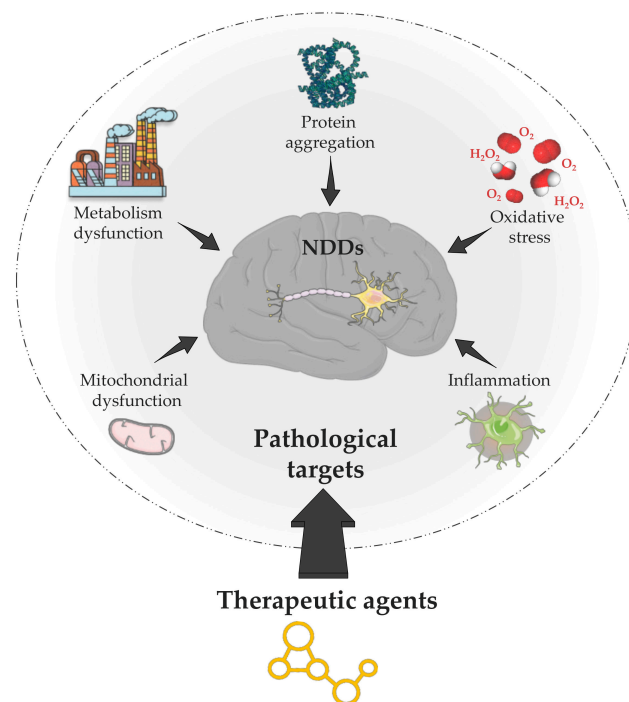


Figure 2. Pathological targets for active substances in the case of the most common NDDs: protein aggregation, oxidative stress, inflammation, mitochondrial, and metabolism dysfunction.

To act on the mechanisms involved in NDDs, the new trend relies on the encapsulation of specific active compounds (natural or synthetic) into PLGA NPs (Table 2).

3.1. Alzheimer's Disease

AD is the most common neurodegenerative disease responsible for a progressive decline in cognitive functions. The association of two neuropathological brain lesions characterizes this pathology: extracellular A β protein and intracellular hyperphosphorylated tau protein deposits [48,49]. Over time, neurodegeneration occurs in the brain regions related to memory and language, from the hippocampal region to the entire cerebral cortex, explaining the progression of the symptoms to aphasia, apraxia, visio-spatial, and executive function disorders [50]. The causes of protein aggregation, into amyloid deposits and neurofibrillary degeneration, are still unknown, but genetic and environmental factors may contribute to their appearance [51]. The protein aggregation may, in turn, induce oxidative stress (OS) leading to neuroinflammation [52]. OS results from an imbalance between the production of free radicals and their detoxification rates by the SuperOxide Dismutase enzyme (SOD) especially.

There is currently no cure for AD, only palliative strategies (tacrine, rivastigmine, etc.) to limit its progression and improve the patient's quality of life, opening the doors for the nanotechnology approach and more especially the PLGA NP one (Table 2).

3.1.1. Thymoquinone

As previously said, AD is linked to protein (i.e., A β) aggregation which may, in turn, induce oxidative stress leading to neuro-inflammation. Yusuf et al. designed PLGA NPs loaded with thymoquinone (TQ), a phytochemical compound, to act on this aspect in animal models due to its potent antioxidant and anti-inflammatory properties (Figure 3) [53,54]. Male albino mice administered with Streptozotocin (SZT) (mimicking AD oxidative stress by a decrease of SOD activity) were treated with TQ loaded PLGA NPs, coated with polysorbate 80 (P-80-TQN). These NP were prepared by the single-emulsion solvent-evaporation method, leading to spherical nano-objects with an average size of 226 ± 4.6 nm and -45.6 ± 2.6 mV as ζ -potential. In vitro, TQ release assessment was characterized by an initial burst for 2 h (drug diffusion from the NP surface and by the beginning of PLGA matrix erosion) followed by a longer sustained release (stabilized dipole-dipole interactions taking place between TQ and PLGA components). The P-80-TQ NPs successfully crossed the BBB by endocytosis through LDL receptors (mediated by the polysorbate coating). Once on-site, these systems significantly affected SOD activity (increase) from day 7 to day 28. Concurrently, an animal and cognition test (Despair test) was undertaken to highlight a meaningful improvement after NP injection, further confirming their beneficial role. Finally, histopathological examinations of brain hippocampal tissues, before and after P-80-TQ NP treatment (5 mg.kg^{-1} equivalent), showed a drastic size reduction of the protein aggregate generated by the STZ-induced AD in mice.

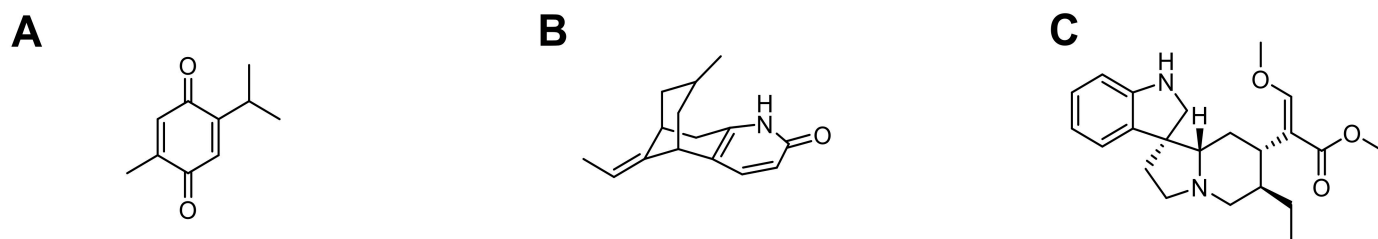


Figure 3. Chemical structures of the three described compounds encapsulated into PLGA NPs for AD treatment (Thymoquinone (A), Huperzine A (B), and Rhynchophylline (C)).

3.1.2. Huperzine A

Meng et al., developed an intranasal drug delivery system (DDS) as PLGA NPs loaded with Huperzine A (HupA) (Figure 3) co-modified with lactoferrin (Lf) to enhance nose-to-brain delivery and N-trimethylchitosan (TMC) for easier mucoadhesion [55]. HupA possesses neuroprotective effects especially in the treatment of AD. Still, it displays a poor brain selectivity resulting in several side effects (including nausea, diarrhea, vomiting, . . .), justifying the need for a more specific DDS [56]. NPs were formulated by the single-emulsion solvent-evaporation method with maleimide-TMC, allowing the further conjugation of thiolated Lf on the maleimide moiety leading to the Lf-TMC-NPs. No cytotoxicity was observed for free HupA and HupA-loaded NPs concentrations ranging from 12.5 to 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ against human bronchial epithelial cell lines (16HBE) used as a model of nasal mucosa cells. The mucoadhesive assessment was evaluated by mucin adsorption onto NPs with a binding efficiency up to 86% compared to unmodified PLGA NPs (32%). Lf-TMC NPs achieved a boost release of HupA in vitro within 4 h followed by a sustained release of 74.5% at 48 h. The cellular uptake of NPs was assessed using 16HBE and SH-SY5Y (human neuroblastoma cell line) cells as brain cell models, using Nile red-loaded NPs. They were taken up in both cell lines with a significantly higher fluorescence intensity for Lf-TMC NPs than unmodified NPs or even TMC-NPs. The same trend was explicitly observed in vivo after intranasal administration of DiR-loaded NPs in mice. A strong signal was obtained with TMC-NPs in the brain, attributed to a better nose-to-brain drug delivery and mucoadhesion provided by TMC. Furthermore, an even larger Lf-TMC NPs was localized in the brain, suggesting a Lf-mediated transport mechanism. Finally, following the intranasal administration of HupA loaded NPs, pharmacokinetics exhibited a minimal elimination rate associated with a greater bioavailability of Lf-TMC NPs, particularly in the olfactory bulb and the memory-related hippocampus.

3.1.3. Rhynchophylline

Rhynchophylline (RIN) is a spirocyclic alkaloid isolated from *Uncaria* species that exhibits numerous pharmacological activities, including neuroprotective effect (Figure 3) [57]. In the case of AD, RIN inhibits soluble $\text{A}\beta$ -induced hyperexcitability of hippocampal neurons. In 2020, the first study on the design and development of brain-targeting therapy for AD using RIN administration was published by Xu et al. [58]. Tween 80 coated methoxy poly (ethylene glycol) PLGA NPs were prepared by nanoprecipitation technique to enhance the pharmacological activity of RIN and targeting purposes. No hemolysis occurred using T80 coated RIN loaded PLGA NPs, suggesting that these NP suspensions were safe to use. Internalization into bEnd.3 cells was confirmed by confocal laser scanning microscopy, using DiD fluorophore-loaded PLGA NPs; T80 coated NPs exhibited higher permeation. To go further, an in-vitro BBB model, with bEnd.3 cells, was developed to study the crossing of such nano-systems and demonstrated their higher transport compared to free RIN or uncoated RIN loaded NPs. The benefits of using T80 for targeting brain was then highlighted in vivo in healthy C57BL/6 mice. Finally, survival rate of PC12 cells injured by $\text{A}\beta_{25-35}$ was improved by incubation with T80 RIN NPs, and cell apoptosis was significantly reduced. These results

confirmed that encapsulation did not affect RIN neuroprotective effects, demonstrating the great potential of loaded PLGA NPs for NDD therapy.

3.2. Parkinson's Disease

PD is the second most common NDD after AD. Three characteristic motor symptoms are associated with Parkinson's syndrome: tremor, akinesia (slowness of movement), and limb rigidity [59]. The disease hallmarks are defined by a selective neuronal dopaminergic loss in specific brain regions, and deposits of misfolded proteins through the presence of α -synuclein aggregates (Lewy bodies, LB). Other pathophysiological symptoms include altered dopamine metabolism, impaired mitochondrial function, oxidative stress, and inflammation. Nowadays, no cure is available for AD, but symptomatic treatments, such as L-dopa (dopamine precursor), can reduce the motor symptoms. This lack of therapeutic alternatives paves the way for the nanotechnology approach, especially using the PLGA system, since this compound was proved biologically active in PD treatment [13,20]. Combining PLGA with active drugs could thus constitute a good option to achieve a synergistic action on PD (Table 2).

3.2.1. Schisantherin A

Schisantherin A (SA) is a dibenzocyclooctadiene with neuroprotective activity against MPP(+) (or 1-methyl-4-phenyl pyridinium, a toxic molecule interfering with oxidative phosphorylation in mitochondria), thus a potential candidate for neuron loss treatment in PD (Figure 4) [60]. In 2017, Chen et al., prepared spherical SA-NPs (\varnothing : 70.6 ± 2.2 nm), by flash nanoprecipitation method, stable for one week at room temperature [61]. For oral administration purposes, the *in vitro* drug release studies were conducted in a simulated gastric fluid with pepsin (SGF, pH 1.2), a simulated intestinal fluid with trypsin (SIF, pH 6.8), and PBS at physiological pH (7.4). All conditions gave an almost similar release pattern with a burst release (25%) in the initial 1 h followed by a sustained release reaching 90–94% at 48 h. DiO and DiI fluorophores were loaded into the NP to form FRET-NPs of similar sizes concerning SA-NPs and were stable for more than four weeks, which is required for cellular uptake studies. MDCK cells were incubated with the fluorescent NPs for 2 h and only a moderately decrease of the FRET signal was observed, indicating a slow intracellular release. The epithelial transport of NPs was also assessed with the same FRET-NPs and showed that a fraction of intact NPs was transported from the apical to the basolateral side. *In vivo* biodistribution studies in adult zebrafish after oral administration for 2 h showed a fast absorption of NPs into the blood circulation before reaching the brain. Similarly, after oral administration of SA-NPs to rats, they directly reached the systemic circulation with a decreased SA elimination rate in plasma (*vs.* control) and even more in the brain, suggesting specific brain targeting properties of this system. Finally, the neuroprotective effect of SA-NPs was evaluated using an MPTP-induced zebrafish model of PD; a decrease of the MPTP-induced neurotoxicity (*vs.* control), involving the Akt/Gsk3 β signaling pathway activation, was observed.

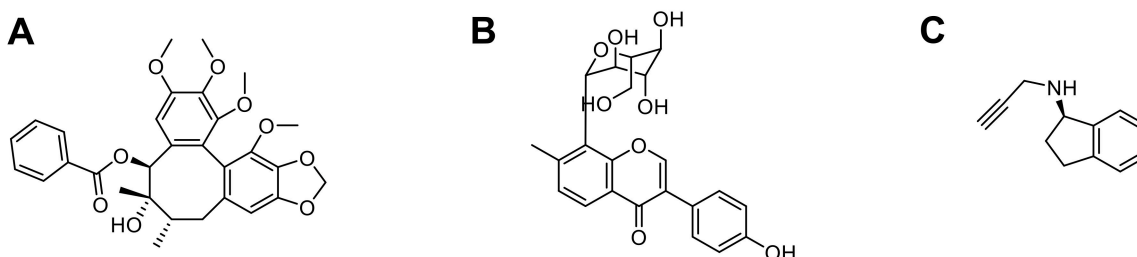


Figure 4. Chemical structures of the three described compounds encapsulated into PLGA NPs for PD treatment (Schisanthrin A (A), Puerarin (B), and Rasagiline (C)).

3.2.2. Puerarin

Puerarin (PU) is a flavonoid glycoside, widely used in China, extracted from the root of the leguminous plant, *Pueraria lobata*, and Thomson Kudzuvine Root (Figure 4). Puerarin displays a series of beneficial activities notably neuroprotection, antioxidant, etc. [62]. In 2019, Chen et al., described the development of PU-loaded PLGA NPs to treat PD while enhancing half-life (pharmacokinetic study in rats) and bioavailability of the drug [63]. Homogeneous suspensions (ϕ : 88.4 ± 1.7 nm and Pdl: 0.047 ± 0.007) of NPs were prepared by nanoprecipitation. Cytotoxicity and internalization of this formulation were investigated in MDCK cells after 24 h and 48 h. Overall, PU-loaded PLGA NPs exhibited no significant toxicity, and the uptake was confirmed. For oral administration purposes, the *in vivo* drug release studies were conducted in adult zebrafish; an effective brain uptake was observed using FRET-NPs (DiO and DiI fluorophores). In a dose-dependent manner (from 10 to 50 μ M), PU NPs prevented cell death (SH-SY5Y cells) by decreasing MPP⁺ neurotoxicity and mitochondrial oxidative stress. Finally, PU-loaded NPs improved behavioral deficits, TH-positive neuron loss and associated mobility impairments (i.e., bradykinesia, fall latency, number of falls, average travel distance or speed), and restored dopamine level and MPTP-mediated neurotoxicity in mice.

3.2.3. Rasagiline

Rasagiline (RA) is a selective irreversible second-generation MAO-B inhibitor, which can be used both as monotherapy and as co-adjuvant therapy in combination with levodopa to treat PD (Figure 4) [64,65]. RA efficacy was evaluated using the Unified PD Rating Scale (UPDR). It showed that patients taking the lowest dose at the earliest possible time had slightly better benefic effects at 18 months than patients who received this dose only at 9 months [66]. To overcome poor solubility issues, low bioavailability and half-life, Bali and Salve designed transdermal films of gellan gum on which RA mesylate-loaded PLGA NPs were embedded [67]. This administration route was a novel approach for the sustained release of NPs. The nano-objects were prepared by double emulsion solvent evaporation technique and characterized by DLS (ϕ : 221.7 ± 5.7 nm) and field emission scanning electron microscopy (FE-SEM). A relatively high Pdl (0.388 ± 0.86) was observed, suggesting a heterogeneous suspension. An *in vivo* study in Wistar rats highlighted an enhanced brain bioavailability using RA-PLGA NPs. Transdermal films slowed down the initial drug release rate followed by a constant release for more than 72 h compared to intravenous or oral administration. The sustained release of RA restored presynaptic depletion of dopamine, inhibited MAO-B enzyme, and prevented neuronal damage caused by oxidative stress in PD model. Finally, gamma scintigraphy study was performed to evaluate BBB permeation and targeting efficiency using ^{99m}Tc-loaded PLGA NPs embedded transdermal film. It was observed that PLGA NPs are targeted from dorsal part toward the brain region of rats. Overall, this study appeared promising for the development of an easy-to-administer DDS able to cross the BBB and target the brain.

3.3. Huntington's Disease

Described in 1872 by George Huntington, HD is a genetic and hereditary disease, due to the mutation of the gene IT15, resulting in the repeat expansion of CAG trinucleotide, coding for the huntingtin protein (mHtt) [68]. Symptoms of HD often appear between the ages of 30 and 50 years old with the onset of progressive motor (involuntary jerking/writhing movements known as chorea, rigidity, muscle contracture, etc.), behavioral (dementia, difficulty of organization and learning) and psychiatric disorders (feelings of irritability, insomnia) [69]. These troubles are associated with the death of striatal neurons in the cortex, the striatum hippocampus and other brain regions such as the thalamus, subthalamic nucleus, and substantia nigra pars reticulata in advanced cases of HD [70,71]. The mutation of the gene IT15 leads to an accumulation of mHtt proteins and formation of toxic neuronal intranuclear inclusions (NIIs). The only drug approved by the regulatory agencies is the tetrabenazine (TBZ) for the symptomatic relief [72]. Research in the area is thus very interesting to expand the therapeutic arsenal, especially via the PLGA NP approach (Table 2).

3.3.1. Oligonucleotides QBP1, NT17, and PGQ₉P²

Published in 2019, Joshi et al., designed peptide-loaded PLGA NPs coated with polysorbate 80 to act on mHtt aggregation. QBP1, NT17, and PGQ₉P² are oligonucleotides exhibiting great inhibitory potential against mutant huntingtin protein aggregation [73,74]. In this study, nanoprecipitation peptide-loaded PLGA NPs were prepared to obtain NPs from 158 to 180 nm in diameter with a low PDI (<0.100) and a ζ potential between -23.3 and -27.5 mV. Polysorbate 80 coating enabled an active targeting to the brain, while improving peptide bioavailability and half-life. Overall, *in vitro* studies performed using Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells suggested that transcytosis was facilitated by absorption of apolipoprotein E (ApoE) and low-density lipoprotein (LDL) receptors. Neutral red PLGA NPs were used to conduct *in vivo* study in healthy mice and confirmed the higher concentration in the brain of polysorbate 80 coated NPs compared to uncoated NPs. The peptide-loaded PLGA NPs displayed dose dependent inhibition of mHtt aggregation in both Neuro 2A and PC12 cell models. Finally, using *Drosophila* model of HD, their ability to improve motor performance was evaluated; after feeding larvae and adult flies with high NT₁₇ and QBP1 concentrations; higher crawling and climbing activities were observed, compared to the control group.

3.3.2. Cholesterol

Cholesterol is a lipid of the sterol family produced by cells and found in food. It is an essential element for synthesizing many hormones, neurotransmitter release, membrane structure, vesicle assembly and fusion. Recently, cholesterol metabolism in the central nervous system of HD patients was described as significantly altered, leading to brain malformations and impaired cognitive functions (Figure 5) [75,76]. A study by Valenza et al., reported the delivery of cholesterol using PLGA NPs to treat HD [77]. Homogenous and monomodal suspensions (ϕ : 200–300 nm, PDI: 0.09–0.3, dose-dependent) of cholesterol-loaded NPs were prepared with various cholesterol concentrations (1, 5, to 10 μ M). *In vitro* studies showed an initial burst release during the first days followed by a constant release (5–10 days), and an internalization into neuron and astrocyte models of HD. *In vivo* assays in R6/2 mice highlighted that cholesterol PLGA NPs crossed the BBB and restored electrophysical phenotypes such as synaptic transmission in striatal medium-sized spiny neuron impairment. Finally, cholesterol supplementation did not significantly improve behavioral issues (locomotion, resting time, rearing) but slowed down the disease progression. Using a novel object recognition test for cognitive task evaluation, the cholesterol treated mice group appeared to benefit from the drug with resolved memory deficits.

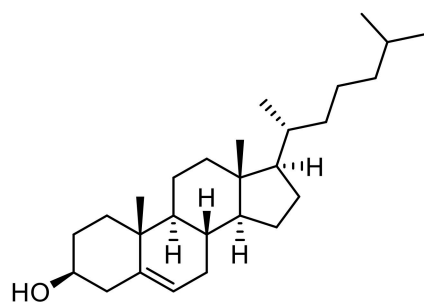


Figure 5. Chemical structure of cholesterol encapsulated into PLGA NPs for HD treatment.

Even if the therapeutic arsenal for HD treatment is limited to TBZ, the current studies open the way to new promising tools.

3.4. Amyotrophic Lateral Sclerosis

ALS, also known as Lou Gehrig's disease, is a NDD involving the motor neurons (motoneurons) located in the anterior horn of the spinal cord and the motor nuclei of the last cranial nerves. ALS results in a progressive paralysis of the muscles responsible for voluntary motor skills. The symptoms go from muscle twitching, cramping, stiffness, weakness, involuntary jerking movements, tremors, to phonation (the production of sounds) and swallowing [78]. No curative treatment is available, and only riluzole is used to delay the disease evolution [79]. New developments of therapeutics for ALS treatment would be very beneficial (Table 2).

PHA-767491

PHA-767491 (PHA) is the first cell division cycle seven kinase inhibitor described as a molecule preventing neurodegeneration, especially in the treatment of ALS (Figure 6) [80]. PHA prevents phosphorylation by CDC7 of TDP-43, a nuclear protein encoded by TARDBP gene-regulating several RNA processes as transcription, mRNA transport, and microRNA biosynthesis. To address low permeability, rapid metabolism, and unspecific distribution issues, Rojas-Prats et al., used PHA-loaded PLGA NPs [81]. They were prepared by nanoprecipitation method and observed by SEM microscopy using gold-coated NPs. The obtained nano-objects exhibited a 141–155 nm diameter with a low PDI (≤ 0.15) characteristic of a monodisperse suspension. Encapsulation of PHA was controlled and confirmed by imaging PHA fluorescence using confocal laser scanning microscopy. An encapsulation efficiency of 12–18% and a drug loading of 2–4% were determined by HPLC. Using porcine lipid to emulate the human BBB, PHA crossing was enhanced, being loaded in the PLGA NPs compared to free PHA. Finally, *in vitro* assays, in the SH-SY5Y cell model of TDP-43 phosphorylation, highlighted a significant protection of neuronal cells from death and decreased TDP-43 phosphorylation.

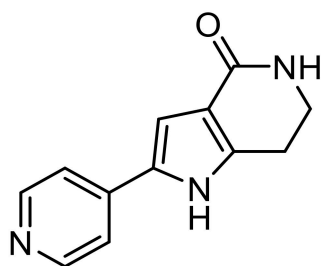


Figure 6. Chemical structure of PHA-767491 encapsulated into PLGA NPs for ALS treatment.

3.5. Multiple Sclerosis

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune inflammatory disease and NDD that attacks the CNS, particularly the brain, nerves, and spinal cord [82]. It involves various pathogenic mechanisms leading to inflammatory infiltrates (T cells, B cells, macrophages) and alteration of the myelin, which forms a protective sheath around the nerve endings, and thus of nerve impulse transmission. Symptoms vary depending on the localization of the attacks: limb numbness, vision troubles, electric shock sensations in a limb or the back, movement dysfunctions, etc. Nowadays, over a dozen therapeutic agents reducing the number of attacks and delaying MS progression are approved by the regulatory agencies. A few of them may be vectorized by PLGA NPs to treat some MS symptoms (Table 2) [83].

3.5.1. Interferon-Beta-1a

Interferon-beta-1a (IFN β -1a) is a naturally occurring protein produced by various cell types including fibroblasts and macrophages. Binding specific receptors exert its biological effect on the human cell surface to slow down MS progression [84]. To decrease drug dosage and improve its controlled release, Fodor-Kardos et al., designed IFN β -1a-loaded PEG-PLGA NPs by double emulsion solvent evaporation method with great encapsulation efficiency (95.9%) [85]. According to the used technic: 165 nm (Pdl: 0.093) by DLS or 50–120 nm by SEM, differences in the NP size were observed by SEM, linked to the hydration of the sample. BSA loaded NPs were also prepared as a model for release kinetics comparison: a significant slower release was observed in the case of PEG-PLGA NPs compared to simple PLGA NPs. Cyanine 5 amine fluorescent dye was conjugated to the NPs to confirm the cellular uptake and the absence of cytotoxicity in vitro in hepatocytes. Finally, in vivo toxicity studies were performed on healthy Wistar male rats. In the first step, the loaded NPs exerted some toxicity due to the fabrication process and potential remains of solvent, while the unloaded ones were safe to use. In the second step, the formulation process was modified to nanoprecipitation, however mild toxic signals were observed for blank PLGA and PEG-PLGA NPs. To go further, a new formulation process will be required to obtain IFN β -1a-loaded PEG-PLGA NPs without or with low in vivo toxicity allowing to investigate the neuroprotective effect of the system.

3.5.2. Leukemia Inhibitory Factor

Leukemia Inhibitory Factor (LIF) is a neural stem cell growth factor belonging to the interleukin-6 family of cytokines. LIF plays an important role in different biological processes, including differentiation of leukemia cells, inflammatory response, neuronal development, etc. [86]. Recent evidence has demonstrated a crucial role of LIF in neuroprotection, axonal regeneration as well as the prevention of demyelination [87]. Preliminary studies to design and prepared PLGA-NG2 NPs, by double emulsion solvent preparation method, as carrier for LIF were performed by Rittchen et al. [88]. Anti-NG2 antibodies, targeting oligodendrocyte precursor cells (OPCs), were attached on the avidin coated NPs. LIF-loaded PLGA NPs were characterized by scanning electron microscopy on a size (126 ± 50 nm) and morphological levels before performing biological assays. In vitro studies attested of the targeting efficiency toward OPCs, and of LIF activity. To evaluate the CNS remyelination properties of NG2-targeted LIF-NPs, in vivo assays were performed on a mouse brain model having received a stereotaxic injection of myelin toxin, lysophosphatidylcholine, into the Corpus callosum. Remyelination was quantified using electron microscopy by measuring the percentage of myelinated axons and myelin thickness. Overall, NG2-targeted LIF-PLGA NPs induced maturation of OPCs to myelin-competent oligodendrocytes within three days and promoted high-quality myelin repair.

3.5.3. Proteolipid Protein (PLP139–151)

In 2020, Ferreira Lima et al., designed antigen (PLP139–151) loaded PLGA NPs using the double emulsion solvent evaporation method to induce antigen-specific tolerance, regulate immune responses, as well as withstand multiple immunogenic challenges in a MS

model. Indeed, this protein was identified as a potent tolerogenic molecule in MS disease. Immunization with this peptide induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in an animal model of MS. Various PLP loaded NPs were prepared with an average diameter of 195.1 ± 10.1 nm for a drug loading of 20%. However, a low encapsulation efficiency (over 60% of PLP not encapsulated) was observed, as well as a complete drug release within the first hours requiring formulation improvements. NPs were incorporated into polymeric microneedles to design a minimal invasive administration system. However, no biological evaluation of the neuroprotective properties of PLP encapsulated PLGA NPs were performed, requiring further studies to confirm their interest.

Table 2. Non-exhaustive summary of neuroprotective drugs vectorized by the PLGA NP approach for NDD treatment (D.L.: Drug Loading, E.E.: Encapsulation Efficiency).

Active Substance	Encapsulation Method	NP Properties	Model of Use	Neuroprotective Activities	Ref.
Alzheimer's Disease					
Rosmarinic acid	Emulsion/solvent diffusion	\varnothing : 60 to 80 nm PDI: 0.047 ζ potential: 2 to 8 mV E.E.: 25 to 40%	In vitro: HBMECs, Has and A β -insulted SK-N-MC cells	Eliminate peroxy nitrite anions Reduce inflammatory responses Disrupt the integrity of HBMEC cytoskeletal microfibrils Decrease the structural density of TJ Increase the permeability and reduce the TEER by targeting HBMECs with the use of 83-14 Mab	[89]
Curcumin <i>Curcuma longa</i>	Single emulsion/solvent evaporation	\varnothing : 150 to 200 nm ζ Potential: -30 to -20 mV	In vitro: GI-1 glioma cells	Inhibit A β fibril formation Reduce brain amyloid level and plaque burden Free-radical scavenging activity	[90]
Rhynchophylline <i>Uncaria rhynchophylla</i>	Nanoprecipitation	\varnothing : 145.2 nm PDI: 0.133 D.L.: 10.3% E.E.: 60%	In vitro: bEnd.3 and PC12 cells In vivo: healthy C57BL/6 mice	Inhibit soluble A β -induced hyperexcitability of hippocampal neurons Reduce cell apoptosis significantly	[58]
Quercetin	Double emulsion/solvent evaporation	$\varnothing < 145$ nm	In vitro: human neuronal cells (SH-SY5Y) In vivo: BALB/c mice	Inhibit AChE and secretase enzymes Disrupt amyloid aggregates Prevent and inhibit A β_{1-42} fibrils formation Dissolve A β_{1-42} aggregates	[91]
iA β 5	Nanoprecipitation	\varnothing : 153 to 166 nm PDI: 0.090 to 0.100 ζ potential: -10.1 to -13 mV E.E.: $63 \pm 9\%$	Porcine brain capillary endothelial cells	N/A	[92]
Phytol	Emulsion/solvent evaporation	\varnothing : 177.4 ± 5.9 nm ζ potential: -32.8 ± 2.2 mV D.L.: 56% E.E.: 92%	In vitro: Neuro2a cells In vivo: healthy male Wistar rats, rats injected with scopolamine	Anti-cholinesterase and anti-oxidative Disrupt amyloid aggregates Attenuate the impairment of learning and memory induced by scopolamine in rat brain Prevent oxidation of proteins and lipids against scopolamine-induced oxidative damage	[93,94]

Table 2. Cont.

Active Substance	Encapsulation Method	NP Properties	Model of Use	Neuroprotective Activities	Ref.
Alzheimer's Disease					
Thymoquinone	Single emulsion/solvent evaporation	\varnothing : 226.3 ± 4.6 nm PdI: 0.143 ζ potential: -45.7 ± 2.6 mV E.E.: $69.5 \pm 3.0\%$	In vivo: STZ-induced Alzheimer model mice	Act on neurosis, ROS formation, free radical scavenging capacity, etc. Prevent A β aggregates and hyperphosphorylated τ -protein tangles	[53]
<i>Nigella sativa</i> oil and Plasmid DNA	Modified solvent diffusion	\varnothing : 600 to 700 nm PdI: 0.229 ζ potential: + 35.6 mV D.L.: 13.0% E.E.: 73.8%	In vitro: murine neuroblastoma (N2a) cells	Inhibit radicals O ₂ Promote neurite outgrowth and neuroregeneration	[95]
Anthocyanins Natural pigments	Emulsion/solvent evaporation	\varnothing : 165 nm PdI: 0.400 ζ potential: -12 mV E.E.: 60%	In vitro: human neuronal cells (SH-SY5Y)	Inhibit A β_{1-42} -induced ROS generation Anti-oxidant	[96]
Huperzine A	Emulsion/solvent evaporation	\varnothing : 78.1 to 153.2 nm PdI: 0.182 to 0.229 ζ potential: -21.2 to +35.6 mV D.L.: 5 to 25% E.E.: 83.2 to 73.8%	In vitro: 16HBE and SH-SY5Y cells In vivo: KM mice	Inhibit acetylcholinesterase Disrupt amyloid aggregates	[55]
Selegiline Methamphetamine derivative	Emulsion/solvent evaporation	\varnothing : 217 to 246 nm PdI: 0.295 to 0.331 ζ potential: 34.7 to 38.0 mV E.E.: 3.3 to 11.7%	In vitro: fibrils (fA β_{1-40} and fA β_{1-42})	Inhibit MAO-B and A β fibrils formation Increase the destabilizing effects of the drug by increasing selegiline concentration and incubation time	[97]
Parkinson's Disease					
Schisantherin A	Flash nanoprecipitation	\varnothing : 70.6 ± 2.2 nm PdI: 0.104 ± 0.012 ζ potential: -24.7 ± 3.5 mV D.L.: $28.0 \pm 0.8\%$ E.E.: $91.1 \pm 2.6\%$	In vitro: SH-SY5Y and MDCK cells In vivo: larval zebrafish, MPTP-induced zebrafish and male Sprague-Dawley rats	Reduce tyrosine hydroxylase TH+ DA neuronal death Prevent MPTP-induced decrease in TH+ region Reverse locomotor deficiency Stronger neuroprotective effects in MPP+ -induced SH-SY5Y cell injury model	[98]

Table 2. Cont.

Active Substance	Encapsulation Method	NP Properties	Model of Use	Neuroprotective Activities	Ref.
Alzheimer's Disease					
Puearin	Antisolvent precipitation	\varnothing : 88.4 ± 1.7 nm PdI: 0.047 ± 0.007 ζ potential: -18.9 ± 2.8 mV D.L.: $43.0 \pm 1.6\%$ E.E.: $89.5 \pm 1.7\%$	In vitro: MDCK and SH-SY5Y cells In vivo: zebrafish and their embryos, male Sprague–Dawley (SD) rats, male C57BL/6 mice (with MPTP group)	Reduce tyrosine hydroxylase TH+ DA neuronal death Reduce behavioral deficits and associated mobility impairments in MPTP-mediated neurotoxicity in mice Reduce TH+ neuron loss and associated neurotoxicity	[63]
Levodopa	Double emulsion/solvent evaporation	\varnothing : 329.0 to 383.7 nm PdI: 0.384 to 0.426 ζ potential: -4.5 to -20.8 mV E.E.: 50.5 to 73.0%	In vitro: PC12 cells In vivo: healthy CD57/BL6 mice (with MPTP group)	Improve locomotor activity over time Improve brain delivery by intranasal route Enhance dopamine concentration in the brain compared to the blood	[99]
Rasagiline	Double emulsion/solvent evaporation	\varnothing : 221.7 ± 5.7 nm PdI: 0.388 ± 0.860 ζ potential: -36.1 ± 4.4 mV E.E.: $29.2 \pm 1.8\%$	In vivo: healthy and Parkinson Wistar rats	Inhibit MAO-B enzyme Prevent neuronal damage caused by oxidative stress	[67]
Huntington's Disease					
Peptides QBP1, NT17, and PGQ ₉ P ²	Nanoprecipitation	\varnothing : 158 to 180 nm PdI: 0.031 to 0.066 ζ potential: -23.3 to -27.5 mV	In vitro: MDCK, Neuro 2A and PC12 cell model of HD In vivo: healthy mice, Drosophila, larvae, and adult fly model of HD	Inhibit mHtt aggregation Restore motor activity	[74]
Cholesterol	Nanoprecipitation	\varnothing : 200 to 300 nm PdI: 0.090 to 0.300 ζ potential: -8 to -12 mV D.L.: 0.7 to 2.5% E.E.: 48 to 68%	In vitro: neural stem (NS) cell model of HD In vivo: genotyping of R6/2 mouse	Restore synaptic alterations and delaying cognitive	[77]
Amyotrophic Lateral Sclerosis					

Table 2. Cont.

Active Substance	Encapsulation Method	NP Properties	Model of Use	Neuroprotective Activities	Ref.
Alzheimer's Disease					
PHA-767491	Nanoprecipitation	\varnothing : 141 to 155 nm PdI \leq 0.150 D.L.: 24% E.E.: 12 to 18%	In vitro: SH-SY5Y cell model of ALS	Reduce TDP-43 phosphorylation	[81]
Multiple Sclerosis					
Interferon- β -1a	Double emulsion/solvent evaporation	\varnothing : 150 to 165 nm PdI: 0.081 to 0.093 ζ potential: 17.7 to 18.8 mV D.L.: 0.7 to 2.5% E.E.: 95.9%	In vitro: human blood plasma, primary hepatocytes from male Wistar rats In vivo: Wistar male rats	N/A	[85]
LIF	Double emulsion/solvent evaporation	\varnothing : 126 ± 50 nm	In vitro: oligodendrocyte precursor cells from neonatal Sprague–Dawley rats	Induce maturation of OPCs to myelin-competent oligodendrocytes within 3 days Promote high-quality myelin repair	[88]
Proteolipid Protein	Double emulsion/solvent evaporation	\varnothing : 195.1 ± 10.1 nm PdI: 0.220 ζ potential: -20 mV D.L.: 20% E.E.: 40%	N/A	N/A	[100]

4. New Candidates for PLGA NPs Vectorization

Many active substances with neuroprotective activities remain to be evaluated for the PLGA NP approach to improve their brain delivery [101–115]. Some of them, such as trehalose, exhort numerous properties ranging from anti-inflammatory to anti-oxidant, which can potentially be applied for out of current applications and NDDs treatment. Trehalose is a non-reducing disaccharide that has been widely used in the food industry (Figure 7). Still, it has also recently shown many unique properties, indicating its potential use in preventing neurodegeneration [105]. It may act as a potent stabilizer of proteins, preserving protein structural integrity and, as an mTOR-independent autophagy inducer, improving the clearance of the mutant proteins that act as autophagy substrates when aberrant protein deposition occurs. Trehalose treatment reduced the level of toxic protein aggregates, which in turn improve behavioral symptoms and survival in animal models of NDDs including AD [106], PD [107,108], and HD [109]. However, trehalose can be cleaved by trehalase, an enzyme observed in different mammalian organs [110]. Therefore, PLGA NPs could be interesting candidates to protect trehalose from degradation and improve its bioavailability.

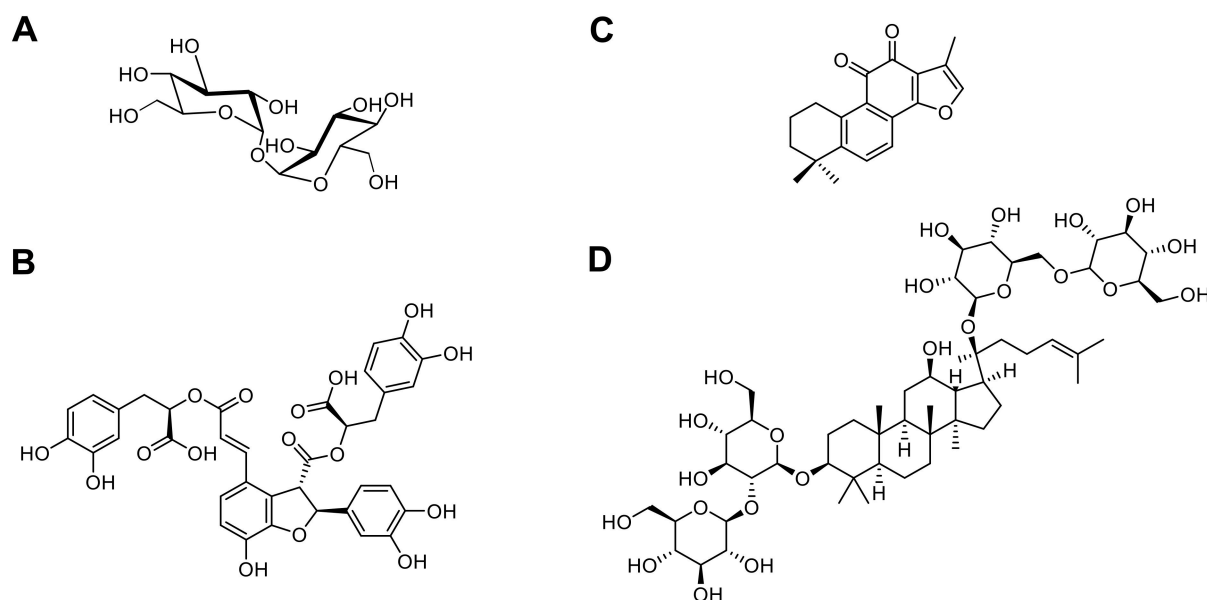


Figure 7. Chemical structures of the four described compounds for AD and PD treatment (Trehalose (A), Salvianolic acid B (B), Tanshinone IIA (C), and Panax notoginsenoside Rb1 (D)).

Another good example is the association of salvianolic acid B (Sal B), tanshinone IIA (TS IIA), and panax notoginsenoside (PNS) (Figure 7), which demonstrated neuroprotective effects on cerebral ischemia reperfusion (I/R) injury. In 2013, Zhang and coworkers encapsulated them into PLGA NPs for brain delivery via the intratympanic route (inner ear administration) [111]. Homogeneous suspensions were obtained by double emulsion solvent evaporation method and composed of particles with a mean diameter of 154 nm. In vitro, loaded PLGA NPs exhibited an excellent sustained release of 76% and 93% of the drug after 72 h for Sal B and PNS, respectively. A slower release was observed for TS IIA (23.6% after 72 h), explained by the drug low solubility in the medium. Pharmacokinetic studies revealed that PLGA NPs improved drug distribution within the inner ear, the CSF, and the brain after intratympanic administration demonstrating the usefulness of this route to deliver drugs without BBB crossing. The anti-oxidant activity of such nanosystems was then evaluated since recent studies confirmed that oxidative stress (SOD, MDA, NOS, ROS and NO) plays a role in the pathogenesis of I/R injury. The lipid peroxidation evaluation showed that drug-loaded PLGA NPs exhibited neuroprotection by regulation of SOD,

MDA, and NOS levels, especially a decrease of MDA and NOS levels validating the antioxidant properties of Sal B, TS IIA, and PNS. Combining these compounds with PLGA NPs may be a very interesting new tool for brain disease treatment, such as AD and PD thanks to their neuroprotective activity. Indeed, Young Woo Lee and coworkers demonstrated that Sal B improved memory impairment caused by A β _{25–35} peptide-induced neuronal damage in AD [103] while Zeng et al., published its ability to protect cells against MPP-induced apoptosis for PD treatment [112]. TS IIA inhibited transcription and translation of iNOS, MMP-2, and NF- κ Bp65, and suppressed expression of NADPH oxidase and iNOS, respectively, involved in AD [113] and PD [114] development. Finally, in AD, PNS Rb1 suppressed the phosphorylated tau protein expression and upregulated the expression levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [115].

5. Conclusions

BBB crossing or the potential degradation of neuroprotective substances remain strategic points needing to be overcome for NDD treatments. In this context, PLGA NPs are a promising approach for new therapeutics. Being both biocompatible and biodegradable, they allow for drug protection, enhance their bioavailability, and possess active targeting capabilities facilitating the delivery to a precise site. These beneficial effects were used for active substance administration (i.e., thymoquinone, curcumin, etc.) and delivery directly into the brain without losing their neuroprotective properties. Moreover, they also demonstrated therapeutic activities such as restoration of the lysosomal pH in the case of PD. Some challenges remain regarding the biological (i.e., biological barrier breaching), technological (i.e., scale-up synthesis), and study design (i.e., data treatment) levels, which impact the potential clinical trials of PLGA NPs. They need to be addressed for the successful development of such therapeutics [116]. However, new guidelines are established to facilitate the transposition from bench to clinic and ensure the product quality and safety [21,117].

Even if these researches are often in the early stages of development, nanovectorization of neuroprotective substances announce future great advances in the pharmaceutical field for NDD treatment.

Author Contributions: A.C. prepared and wrote the original draft. A.G., L.L. and B.D. collectively corrected the draft of the Review, including text and figures. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Fondation de France, grant number 00066525 and by IDEX Emergence Grant number OPE-2018-410 (B.D.). A.C. is a recipient of a MSER fellowship (France). We thank Le collège des écoles doctorales (appel doctorat interdisciplinaire 2018) for financial support.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We apologize to the authors of several high-quality scientific articles that contributed significantly to the development of the field, which could not be cited due to space limits.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Scott, A.M. Global Burden of Neuropsychiatric Disorders. *Alzheimer's Dis. Int. World's Alzheimer's Rep.* **2017**, *2015*, 10.
2. Feigin, V.L.; Krishnamurthi, R.V.; Theadom, A.M.; Abajobir, A.A.; Mishra, S.R.; Ahmed, M.B.; Abate, K.H.; Mengistie, M.A.; Wakayo, T.; Abd-Allah, F.; et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol.* **2017**, *16*, 877–897. [[CrossRef](#)]
3. Furuse, M. Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a002907. [[CrossRef](#)]
4. Pardridge, W.M. Drug transport across the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, *32*, 1959–1972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Nichols, E.; Szoeko, C.E.I.; Vollset, S.E.; Abbasi, N.; Abd-Allah, F.; Abdela, J.; Aichour, M.T.E.; Akinyemi, R.O.; Alahdab, F.; Asgedom, S.W.; et al. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2019**, *18*, 88–106. [[CrossRef](#)]
6. Tysnes, O.-B.; Storstein, A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **2017**, *124*, 901–905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Baig, S.S.; Strong, M.; Quarrell, O.W. The global prevalence of Huntington's disease: A systematic review and discussion. *Neurodegener. Dis. Manag.* **2016**, *6*, 331–343. [[CrossRef](#)]
8. Xu, L.; Liu, T.; Liu, L.; Yao, X.; Chen, L.; Fan, D.; Zhan, S.; Wang, S. Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *J. Neurol.* **2020**, *267*, 944–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Walton, C.; King, R.; Rechtman, L.; Kaye, W.; Leray, E.; Marrie, R.A.; Robertson, N.; La Rocca, N.; Uitdehaag, B.; van der Mei, I.; et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult. Scler. J.* **2020**, *26*, 1816–1821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Naqvi, S.; Panghal, A.; Flora, S.J.S. Nanotechnology: A Promising Approach for Delivery of Neuroprotective Drugs. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 1–26. [[CrossRef](#)]
11. Brambilla, D.; Le Droumaguet, B.; Nicolas, J.; Hashemi, S.H.; Wu, L.P.; Moghimi, S.M.; Couvreur, P.; Andrieux, K. Nanotechnologies for Alzheimer's disease: Diagnosis, therapy, and safety issues. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2011**, *7*, 521–540. [[CrossRef](#)]
12. Leyva-Gómez, G.; Cortés, H.; Magaña, J.J.; Leyva-García, N.; Quintanar-Guerrero, D.; Florán, B. Nanoparticle technology for treatment of Parkinson's disease: The role of surface phenomena in reaching the brain. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 824–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bourdenx, M.; Daniel, J.; Genin, E.; Soria, F.N.; Blanchard-Desce, M.; Bezdard, E.; Dehay, B. Nanoparticles restore lysosomal acidification defects: Implications for Parkinson and other lysosomal-related diseases. *Autophagy* **2016**, *12*, 472–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Essa, D.; Kondiah, P.P.D.; Choonara, Y.E.; Pillay, V. The Design of Poly(lactide-co-glycolide) Nanocarriers for Medical Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 1–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Operti, M.C.; Bernhardt, A.; Grimm, S.; Engel, A.; Figdor, C.G.; Tagit, O. PLGA-based nanomedicines manufacturing: Technologies overview and challenges in industrial scale-up. *Int. J. Pharm.* **2021**, *605*, 120807. [[CrossRef](#)]
16. Cano, A.; Sánchez-López, E.; Ettcheto, M.; López-Machado, A.; Espina, M.; Souto, E.B.; Galindo, R.; Camins, A.; García, M.L.; Turowski, P. Current advances in the development of novel polymeric nanoparticles for the treatment of neurodegenerative diseases. *Nanomedicine* **2020**, *15*, 1239–1261. [[CrossRef](#)]
17. Makadia, H.K.; Siegel, S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* **2011**, *3*, 1377–1397. [[CrossRef](#)]
18. Anderson, J.M.; Shive, M.S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *28*, 5–24. [[CrossRef](#)]
19. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Prétat, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 505–522. [[CrossRef](#)]
20. Zeng, J.; Martin, A.; Han, X.; Shirihai, O.S.; Grinstaff, M.W. Biodegradable plga nanoparticles restore lysosomal acidity and protect neural pc-12 cells against mitochondrial toxicity. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2019**, *58*, 13910–13917. [[CrossRef](#)]
21. Zhi, K.; Raji, B.; Nookala, A.R.; Khan, M.M.; Nguyen, X.H.; Sakshi, S.; Pourmotabbed, T.; Yallapu, M.M.; Kochat, H.; Tadrous, E.; et al. Plga nanoparticle-based formulations to cross the blood-brain barrier for drug delivery: From r&d to cgm. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 500.
22. McCall, R.L.; Sirianni, R.W. PLGA nanoparticles formed by single- or double-emulsion with vitamin E-TPGS. *J. Vis. Exp.* **2013**, *82*, 51015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Huang, W.; Zhang, C. Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation. *Biotechnol. J.* **2018**, *13*, 1700203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ryu, S.; Park, S.; Lee, H.Y.; Lee, H.; Cho, C.W.; Baek, J.S. Biodegradable Nanoparticles-Loaded PLGA Microcapsule for the Enhanced Encapsulation Efficiency and Controlled Release of Hydrophilic Drug. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2792. [[CrossRef](#)]
25. Moghimi, S.M.; Moghimi, S.M.; Hunter, A.C.; Murray, J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 283–318.
26. Hoshyar, N.; Gray, S.; Han, H.; Bao, G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine* **2016**, *11*, 673–692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 57. [[CrossRef](#)]
28. Kumar, A.; Dixit, C.K. Methods for characterization of nanoparticles. In *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 43–58. ISBN 9780081005637.
29. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 5577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Mulvihill, J.J.; Cunnane, E.M.; Ross, A.M.; Duskey, J.T.; Tosi, G.; Grabrucker, A.M. Drug delivery across the blood-brain barrier: Recent advances in the use of nanocarriers. *Nanomedicine* **2020**, *15*, 205–214. [[CrossRef](#)]

31. Wünsch, A.; Mulac, D.; Langer, K. Lecithin coating as universal stabilization and functionalization strategy for nanosized drug carriers to overcome the blood–brain barrier. *Int. J. Pharm.* **2021**, *593*, 120146. [[CrossRef](#)]
32. Yoo, J.; Park, C.; Yi, G.; Lee, D.; Koo, H. Active targeting strategies using biological ligands for nanoparticle drug delivery systems. *Cancers* **2019**, *11*, 640. [[CrossRef](#)]
33. Ray, S.; Sinha, P.; Laha, B.; Maiti, S.; Bhattacharyya, U.K.; Nayak, A.K. Polysorbate 80 coated crosslinked chitosan nanoparticles of ropinirole hydrochloride for brain targeting. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, *48*, 21–29. [[CrossRef](#)]
34. Joshi, A.S.; Gahane, A.; Thakur, A.K. Deciphering the mechanism and structural features of polysorbate 80 during adsorption on PLGA nanoparticles by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 108545–108557. [[CrossRef](#)]
35. Schwartzberg, L.S.; Navari, R.M. Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting. *Adv. Ther.* **2018**, *35*, 754–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Baskin, J.; Jeon, J.E.; Lewis, S.J.G. Nanoparticles for drug delivery in Parkinson’s disease. *J. Neurol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Gulati, N.M.; Stewart, P.L.; Steinmetz, N.F. Bio inspired shielding strategies for nanoparticle drug delivery applications Graphical Abstract. *Mol. Pharm* **2018**, *15*, 2900–2909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Suk, J.S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L.M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28–51. [[CrossRef](#)]
39. Hu, K.; Shi, Y.; Jiang, W.; Han, J.; Huang, S.; Jiang, X. Lactoferrin conjugated PEG-PLGA nanoparticles for brain delivery: Preparation, characterization and efficacy in Parkinsons disease. *Int. J. Pharm.* **2011**, *415*, 273–283. [[CrossRef](#)]
40. Torres-Ortega, P.V.; Saludas, L.; Hanafy, A.S.; Garbayo, E.; Blanco-Prieto, M.J. Micro- and nanotechnology approaches to improve Parkinson’s disease therapy. *J. Control. Release* **2019**, *295*, 201–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Appelboom, G.; Detappe, A.; LoPresti, M.; Kunjachan, S.; Mitrasinovic, S.; Goldman, S.; Chang, S.D.; Tillement, O. Stereotactic modulation of blood-brain barrier permeability to enhance drug delivery. *Neuro Oncol.* **2016**, *18*, 1601–1609. [[CrossRef](#)]
42. Jaiswal, M.; Dudhe, R.; Sharma, P.K. Nanoemulsion: An advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech* **2015**, *5*, 123–127. [[CrossRef](#)]
43. Gosselet, F.; Loiola, R.A.; Roig, A.; Rosell, A.; Culot, M. Central nervous system delivery of molecules across the blood-brain barrier. *Neurochem. Int.* **2021**, *144*, 104952. [[CrossRef](#)]
44. Sharma, D.; Sharma, R.K.; Sharma, N.; Gabrani, R.; Sharma, S.K.; Ali, J.; Dang, S. Nose-To-Brain Delivery of PLGA-Diazepam Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* **2015**, *16*, 1108–1121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Masserini, M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery. *ISRN Biochem.* **2013**, *2013*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Tarawneh, R.; Galvin, J.E. Potential Future Neuroprotective Therapies for Neurodegenerative Disorders and Stroke. *Clin. Geriatr. Med.* **2010**, *26*, 125–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Tapias, V. Editorial: Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 1372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Murphy, M.P.; Levine, H. Alzheimer’s disease and the amyloid- β peptide. *J. Alzheimer’s Dis.* **2010**, *19*, 311–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Iqbal, K.; Liu, F.; Gong, C.-X.; Grundke-Iqbal, I. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Curr. Alzheimer Res.* **2010**, *7*, 656–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Gallagher, D.J.; Mhaolaín, A.N.; Sperling, R.A.; Lawlor, B.A. Alzheimer’s Disease. In *Neurodegenerative Disorders*; Springer: London, UK, 2011; pp. 43–64.
51. Armstrong, R.A. Risk factors for Alzheimer’s disease. *Folia Neuropathol.* **2019**, *57*, 87–105. [[CrossRef](#)]
52. Huang, W.-J.; Zhang, X.; Chen, W.-W. Role of oxidative stress in Alzheimer’s disease. *Biomed. Rep.* **2016**, *4*, 519–522. [[CrossRef](#)]
53. Yusuf, M.; Khan, M.; Alrobaian, M.M.; Alghamdi, S.A.; Warsi, M.H.; Sultana, S.; Khan, R.A. Brain targeted Polysorbate-80 coated PLGA thymoquinone nanoparticles for the treatment of Alzheimer’s disease, with biomechanistic insights. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *61*, 102214. [[CrossRef](#)]
54. Elibol, B.; Beker, M.; Terzioğlu-Usak, S.; Dalli, T.; Kilic, U. Thymoquinone administration ameliorates Alzheimer’s disease-like phenotype by promoting cell survival in the hippocampus of amyloid beta1–42 infused rat model. *Phytomedicine* **2020**, *79*, 153324. [[CrossRef](#)]
55. Meng, Q.; Wang, A.; Hua, H.; Jiang, Y.; Wang, Y.; Mu, H.; Wu, Z.; Sun, K. Intranasal delivery of Huperzine A to the brain using lactoferrin-conjugated N-trimethylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for treatment of Alzheimer’s disease. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 705–718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ma, T.; Gong, K.; Yan, Y.; Zhang, L.; Tang, P.; Zhang, X.; Gong, Y. Huperzine A promotes hippocampal neurogenesis in vitro and in vivo. *Brain Res.* **2013**, *1506*, 35–43. [[CrossRef](#)]
57. Shao, H.; Mi, Z.; Ji, W.G.; Zhang, C.H.; Zhang, T.; Ren, S.C.; Zhu, Z.R. Rhynchophylline Protects Against the Amyloid β -Induced Increase of Spontaneous Discharges in the Hippocampal CA1 Region of Rats. *Neurochem. Res.* **2015**, *40*, 2365–2373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Xu, R.; Wang, J.; Xu, J.; Song, X.; Huang, H.; Feng, Y.; Fu, C. Rhynchophylline loaded-mPEG-PLGA nanoparticles coated with tween-80 for preliminary study in Alzheimer’s disease. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 1149–1160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Walsh, R.A.; Lynch, T.; Fahner, S. Parkinson’s Disease. In *Neurodegenerative Disorders*; Springer: London, UK, 2011; pp. 77–114.
60. Sa, F.; Zhang, L.Q.; Chong, C.M.; Guo, B.J.; Li, S.; Zhang, Z.J.; Zheng, Y.; Hoi, P.M.; Lee, S.M.Y. Discovery of novel anti-parkinsonian effect of schisantherin A in in vitro and in vivo. *Neurosci. Lett.* **2015**, *593*, 7–12. [[CrossRef](#)]

61. Huang, J.L.; Jing, X.; Tian, X.; Qin, M.C.; Xu, Z.H.; Wu, D.P.; Zhong, Z.G. Neuroprotective properties of panax notoginseng saponins via preventing oxidative stress injury in SAMP8 mice. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2017**, *2017*. [[CrossRef](#)]
62. Zhang, X.; Xiong, J.; Liu, S.; Wang, L.; Huang, J.; Liu, L.; Yang, J.; Zhang, G.; Guo, K.; Zhang, Z.; et al. Puerarin protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. *Neuroscience* **2014**, *280*, 88–98. [[CrossRef](#)]
63. Chen, T.; Liu, W.; Xiong, S.; Li, D.; Fang, S.; Wu, Z.; Wang, Q.; Chen, X. Nanoparticles mediating the sustained puerarin release facilitate improved brain delivery to treat parkinson's disease. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 45276–45289. [[CrossRef](#)]
64. Fernandez, H. Malaty Role of rasagiline in treating Parkinson's disease: Effect on disease progression. *Clin. Risk Manag.* **2009**, *5*, 413. [[CrossRef](#)]
65. Hattori, N.; Takeda, A.; Takeda, S.; Nishimura, A.; Kitagawa, T.; Mochizuki, H.; Nagai, M.; Takahashi, R. Rasagiline monotherapy in early Parkinson's disease: A phase 3, randomized study in Japan. *Park. Relat. Disord.* **2019**, *60*, 146–152. [[CrossRef](#)]
66. Hauser, R.A.; Ablner, V.; Eyal, E.; Eliaz, R.E. Efficacy of rasagiline in early Parkinson's disease: A meta-analysis of data from the TEMPO and ADAGIO studies. *Int. J. Neurosci.* **2016**, *126*, 942–946. [[CrossRef](#)]
67. Bali, N.R.; Salve, P.S. Impact of rasagiline nanoparticles on brain targeting efficiency via gellan gum based transdermal patch: A nanotheranostic perspective for Parkinsonism. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 1006–1024. [[CrossRef](#)]
68. Myers, R.H. Huntington's Disease Genetics. *NeuroRx* **2004**, *1*, 255–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Pender, N.P.; Koroshetz, W.J. Huntington's Disease. In *Neurodegenerative Disorders*; Springer: London, UK, 2011; pp. 167–179.
70. Ferrante, R.J.; Kowall, N.W.; Beal, M.F.; Richardson, E.P.; Bird, E.D.; Martin, J.B. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* **1985**, *230*, 561–563. [[CrossRef](#)]
71. Rubinsztein, D.C. Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet.* **2002**, *18*, 202–209. [[CrossRef](#)]
72. Sung, V.W.; Iyer, R.; Schilling, T.; Buzinec, P.N. Tetrabenazine Use in Patients With Huntington's Disease (HD) Chorea (P2.009). *Neurology* **2017**, *88*, 545–551.
73. Burra, G.; Thakur, A.K. Inhibition of polyglutamine aggregation by SIMILAR huntingtin N-terminal sequences: Prospective molecules for preclinical evaluation in Huntington's disease. *Biopolymers* **2017**, *108*, e23021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Joshi, A.S.; Singh, V.; Gahane, A.; Thakur, A.K. Biodegradable Nanoparticles Containing Mechanism Based Peptide Inhibitors Reduce Polyglutamine Aggregation in Cell Models and Alleviate Motor Symptoms in a Drosophila Model of Huntington's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10*, 1603–1614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Leoni, V.; Caccia, C. The impairment of cholesterol metabolism in Huntington disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2015**, *1851*, 1095–1105. [[CrossRef](#)]
76. Block, R.C.; Dorsey, E.R.; Beck, C.A.; Brenna, J.T.; Shoulson, I. Altered cholesterol and fatty acid metabolism in Huntington disease. *J. Clin. Lipidol.* **2010**, *4*, 17–23. [[CrossRef](#)]
77. Valenza, M.; Chen, J.Y.; Di Paolo, E.; Ruozi, B.; Belletti, D.; Ferrari Bardile, C.; Leoni, V.; Caccia, C.; Brilli, E.; Di Donato, S.; et al. Cholesterol-loaded nanoparticles ameliorate synaptic and cognitive function in H untington's disease mice. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7*, 1547–1564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Hardiman, O. Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *Neurodegenerative Disorders*; Springer: London, UK, 2011; Volume 59, pp. 143–166.
79. Andrews, J.A.; Jackson, C.E.; Heiman-Patterson, T.D.; Bettica, P.; Brooks, B.R.; Pioro, E.P. Real-world evidence of riluzole effectiveness in treating amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **2020**, *21*, 509–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Chung, Y.H.; Lin, C.W.; Huang, H.Y.; Chen, S.L.; Huang, H.J.; Sun, Y.C.; Lee, G.C.; Lee-Chen, G.J.; Chang, Y.C.; Hsieh-Li, H.M. Targeting Inflammation, PHA-767491 Shows a Broad Spectrum in Protein Aggregation Diseases. *J. Mol. Neurosci.* **2020**, *70*, 1140–1152. [[CrossRef](#)]
81. Rojas-Prats, E.; Tosat-Bitrián, C.; Martínez-González, L.; Nozal, V.; Pérez, D.I.; Martínez, A. Increasing Brain Permeability of PHA-767491, a Cell Division Cycle 7 Kinase Inhibitor, with Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Dobson, R.; Giovannoni, G. Multiple sclerosis—A review. *Eur. J. Neurol.* **2019**, *26*, 27–40. [[CrossRef](#)]
83. Chountoulesi, M.; Demetzos, C. Promising nanotechnology approaches in treatment of autoimmune diseases of central nervous system. *Brain Sci.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Clerico, M.; Contessa, G.; Durelli, L. Interferon-β 1a for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin. Biol.* **2007**, *7*, 535–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Fodor-Kardos, A.; Kiss, Á.F.; Monostory, K.; Feczko, T. Sustained: In vitro interferon-beta release and in vivo toxicity of PLGA and PEG-PLGA nanoparticles. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 15893–15900. [[CrossRef](#)]
86. Yue, X.; Wu, L.; Hu, W. The Regulation of Leukemia Inhibitory Factor. *Cancer Cell Microenviron.* **2015**, *2*, e877.
87. Slaets, H.; Hendriks, J.J.A.; Stinissen, P.; Kilpatrick, T.J.; Hellings, N. Therapeutic potential of LIF in multiple sclerosis. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 493–500. [[CrossRef](#)]
88. Rittchen, S.; Boyd, A.; Burns, A.; Park, J.; Fahmy, T.M.; Metcalfe, S.; Williams, A. Myelin repair invivo is increased by targeting oligodendrocyte precursor cells with nanoparticles encapsulating leukaemia inhibitory factor (LIF). *Biomaterials* **2015**, *56*, 78–85. [[CrossRef](#)]
89. Kuo, Y.C.; Tsai, H.C. Rosmarinic acid- and curcumin-loaded polyacrylamide-cardiolipin-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with conjugated 83–14 monoclonal antibody to protect β-amyloid-insulted neurons. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *91*, 445–457. [[CrossRef](#)]

90. Mathew, A.; Fukuda, T.; Nagaoka, Y.; Hasumura, T.; Morimoto, H.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Venugopal, K.; Kumar, D.S. Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Sun, D.; Li, N.; Zhang, W.; Zhao, Z.; Mou, Z.; Huang, D.; Liu, J.; Wang, W. Design of PLGA-functionalized quercetin nanoparticles for potential use in Alzheimer's disease. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *148*, 116–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Loureiro, J.A.; Gomes, B.; Fricker, G.; Coelho, M.A.N.; Rocha, S.; Pereira, M.C. Cellular uptake of PLGA nanoparticles targeted with anti-amyloid and anti-transferrin receptor antibodies for Alzheimer's disease treatment. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *145*, 8–13. [[CrossRef](#)]
93. Sathya, S.; Manogari, B.G.; Thamaraiselvi, K.; Vaidevi, S.; Ruckmani, K.; Devi, K.P. Phytol loaded PLGA nanoparticles ameliorate scopolamine-induced cognitive dysfunction by attenuating cholinesterase activity, oxidative stress and apoptosis in Wistar rat. *Nutr. Neurosci.* **2020**, *8305*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Sathya, S.; Shanmuganathan, B.; Saranya, S.; Vaidevi, S.; Ruckmani, K.; Pandima Devi, K. Phytol-loaded PLGA nanoparticle as a modulator of Alzheimer's toxic A β peptide aggregation and fibrillation associated with impaired neuronal cell function. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, 1719–1730. [[CrossRef](#)]
95. Doolaanea, A.A.; Mansor, N.I.; Mohd Nor, N.H.; Mohamed, F. Co-encapsulation of Nigella sativa oil and plasmid DNA for enhanced gene therapy of Alzheimers disease. *J. Microencapsul.* **2016**, *33*, 114–126. [[CrossRef](#)]
96. Amin, F.U.; Shah, S.A.; Badshah, H.; Khan, M.; Kim, M.O. Anthocyanins encapsulated by PLGA@PEG nanoparticles potentially improved its free radical scavenging capabilities via p38/JNK pathway against A β 1-42-induced oxidative stress. *J. Nanobiotechnol.* **2017**, *15*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Baysal, I.; Yabanoglu-Ciftci, S.; Tunc-Sarisozen, Y.; Ulubayram, K.; Ucar, G. Interaction of selegiline-loaded PLGA-b-PEG nanoparticles with beta-amyloid fibrils. *J. Neural Transm.* **2013**, *120*, 903–910. [[CrossRef](#)]
98. Chen, T.; Li, C.; Li, Y.; Yi, X.; Wang, R.; Lee, S.M.Y.; Zheng, Y. Small-Sized mPEG-PLGA Nanoparticles of Schisantherin A with Sustained Release for Enhanced Brain Uptake and Anti-Parkinsonian Activity. *Acs Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 9516–9527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Arisoy, S.; Sayiner, O.; Comoglu, T.; Onal, D.; Atalay, O.; Pehlivanoglu, B. In vitro and in vivo evaluation of levodopa-loaded nanoparticles for nose to brain delivery. *Pharm. Dev. Technol.* **2020**, *25*, 735–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Lima, A.F.; Amado, I.R.; Pires, L.R. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (plga) nanoparticles loaded with proteolipid protein (plp)—exploring a new administration route. *Polymer* **2020**, *12*, 1–10.
101. Mohd Sairazi, N.S.; Sirajudeen, K.N.S. Natural Products and Their Bioactive Compounds: Neuroprotective Potentials against Neurodegenerative Diseases. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2020**, *2020*, 5–7. [[CrossRef](#)]
102. Carrera, I.; Cacabelos, R. Current Drugs and Potential Future Neuroprotective Compounds for Parkinson's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* **2018**, *17*, 295–306. [[CrossRef](#)]
103. Lee, Y.W.; Kim, D.H.; Jeon, S.J.; Park, S.J.; Kim, J.M.; Jung, J.M.; Lee, H.E.; Bae, S.G.; Oh, H.K.; Ho Son, K.H.; et al. Neuroprotective effects of salvianolic acid B on an A β 25-35 peptide-induced mouse model of Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *704*, 70–77. [[CrossRef](#)]
104. Wang, Z.-Y.; Liu, J.-G.; Li, H.; Yang, H.-M. Pharmacological Effects of Active Components of Chinese Herbal Medicine in the Treatment of Alzheimer's Disease: A Review. *Am. J. Chin. Med.* **2016**, *44*, 1525–1541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Emanuele, E. Can Trehalose Prevent Neurodegeneration? Insights from Experimental Studies. *Curr. Drug Targets* **2014**, *15*, 551–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Liu, R.; Barkhordarian, H.; Emadi, S.; Chan, B.P.; Sierks, M.R. Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 74–81. [[CrossRef](#)]
107. Sarkar, S.; Davies, J.E.; Huang, Z.; Tunnacliffe, A.; Rubinsztein, D.C. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 5641–5652. [[CrossRef](#)]
108. Khalifeh, M.; Barreto, G.E.; Sahebkar, A. Trehalose as a promising therapeutic candidate for the treatment of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 1173–1189. [[CrossRef](#)]
109. Tanaka, M.; Machida, Y.; Niu, S.; Ikeda, T.; Jana, N.R.; Doi, H.; Kurosawa, M.; Nekooki, M.; Nukina, N. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 148–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Halbe, L.; Rami, A. Trehalase localization in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of mouse brains. *J. Adv. Res.* **2019**, *18*, 71–79. [[CrossRef](#)]
111. Zhang, X.; Chen, G.; Wen, L.; Yang, F.; Shao, A.L.; Li, X.; Long, W.; Mu, L. Novel multiple agents loaded PLGA nanoparticles for brain delivery via inner ear administration: In vitro and in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48*, 595–603. [[CrossRef](#)]
112. Zeng, G.; Tang, T.; Wu, H.J.; You, W.H.; Luo, J.K.; Lin, Y.; Liang, Q.H.; Li, X.Q.; Huang, X.; Yang, Q.D. Salvianolic acid b protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *33*, 1337–1342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Jiang, P.; Li, C.; Xiang, Z.; Jiao, B. Tanshinone IIA reduces the risk of Alzheimer's disease by inhibiting iNOS, MMP-2 and NF- κ Bp65 transcription and translation in the temporal lobes of rat models of Alzheimer's disease. *Mol. Med. Rep.* **2014**, *10*, 689–694. [[CrossRef](#)]

114. Ren, B.; Zhang, Y.X.; Zhou, H.X.; Sun, F.W.; Zhang, Z.F.; Wei, Z.F.; Zhang, C.Y.; Si, D.W. Tanshinone IIA prevents the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons by inhibiting NADPH oxidase and iNOS in the MPTP model of Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **2015**, *348*, 142–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Wang, Y.; Feng, Y.; Fu, Q.; Li, L. Panax notoginsenoside Rb1 ameliorates Alzheimer's disease by upregulating brain-derived neurotrophic factor and downregulating Tau protein expression. *Exp. Ther. Med.* **2013**, *6*, 826–830. [[CrossRef](#)]
116. Anselmo, A.C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the clinic. *Bioeng. Transl. Med.* **2016**, *1*, 10–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. US FDA CDER. *Current Good Manufacturing Practice (CGMP) Regulations*; FDA: Silver Spring, MD, USA, 2018; p. 5.

Article - *Synthesis and Intracellular Uptake of Rhodamine–Nucleolipid Conjugates into a Nanoemulsion Vehicle*

Résumé en français :

Les maladies neurodégénératives représentent certains des plus grands défis pour la science fondamentale et la médecine clinique. En raison de leur prévalence et de l'absence de traitements biochimiques connus, ces pathologies complexes entraînent un coût sociétal croissant. De plus en plus de preuves génétiques et neuropathologiques indiquent que l'altération lysosomale pourrait être un facteur commun à ces maladies, ce qui nécessite le développement de stratégies thérapeutiques visant à restaurer la fonction lysosomale. Nous proposons ici la conception et la synthèse d'un conjugué nucléolipide comme nanovecteur chimique non viral pour cibler spécifiquement les cellules neuronales et les organelles intracellulaires. Dans cette étude, la thymidine, substituée de manière appropriée pour augmenter sa lipophilie, a été utilisée comme nucléoside modèle et une partie fluorophore, liée de manière covalente au nucléoside, a permis de suivre l'internalisation du nucléolipide *in vitro*. Pour améliorer la protection des nucléolipides et l'absorption cellulaire, ces conjugués ont été formulés dans des nanoémulsions. Les tests biologiques *in vitro* ont démontré une colocalisation associée à l'absorption cellulaire et à l'internalisation avec des marqueurs lysosomaux. Dans l'ensemble, cette formulation à base de nucléolipides et de nanoémulsions représente un outil prometteur de délivrance de médicaments pour cibler le SNC, capable de délivrer des médicaments pour restaurer la fonction lysosomale altérée.

Synthesis and Intracellular Uptake of Rhodamine–Nucleolipid Conjugates into a Nanoemulsion Vehicle

Anthony Cunha, Geoffrey Prévot, Yannick Mousli, Philippe Barthélémy, Sylvie Crauste-Manciet, Benjamin Dehay,* and Valérie Desvergnès*

Cite This: *ACS Omega* 2020, 5, 5815–5823

Read Online

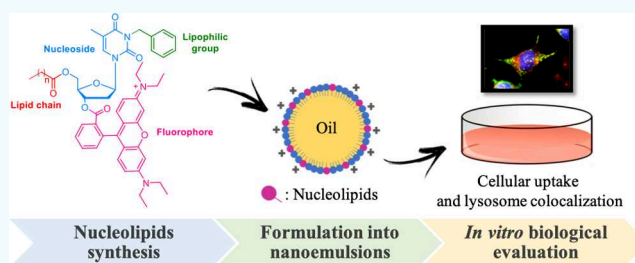
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Neurodegenerative diseases represent some of the greatest challenges for both basic science and clinical medicine. Due to their prevalence and the lack of known biochemical-based treatments, these complex pathologies result in an increasing societal cost. Increasing genetic and neuropathological evidence indicates that lysosomal impairment may be a common factor linking these diseases, demanding the development of therapeutic strategies aimed at restoring the lysosomal function. Here, we propose the design and synthesis of a nucleolipid conjugate as a nonviral chemical nanovector to specifically target neuronal cells and intracellular organelles. Herein, thymidine, appropriately substituted to increase its lipophilicity, was used as a model nucleoside and a fluorophore moiety, covalently bound to the nucleoside, allowed the monitoring of nucleolipid internalization in vitro. To improve nucleolipid protection and cellular uptake, these conjugates were formulated in nanoemulsions. In vitro biological assays demonstrated cell uptake- and internalization-associated colocalization with lysosomal markers. Overall, this nucleolipid–nanoemulsion-based formulation represents a promising drug-delivery tool to target the central nervous system, able to deliver drugs to restore the impaired lysosomal function.



INTRODUCTION

The selective filter of the blood–brain barrier (BBB) is one of the major obstacles to the achievement of efficient drug delivery^{1,2} and therapeutic effect to the brain,^{3,4} which hampers further treatments for brain-related diseases. Nowadays, innovation in the field of nanosystems allows a better crossing of biological membranes, thus paving the way for new therapeutic approaches.^{1,3,5} Nucleolipids (NLs) are bifunctional hybrid molecules in which a lipid moiety and a nucleic acid moiety (nucleoside, nucleotide, nucleobase, or oligonucleotide) are covalently linked.⁶ Exhibiting a wide structural variety, these molecules can be natural such as algalasine F and tunicamycin^{7,8} or of synthetic origin like the DOTAU.⁹ NLs, either natural or synthetic, are interesting not only for their potential biological activities, including antimicrobial, antifungal, antiviral, and antitumor properties,^{10–12} but also for their remarkable ability to self-assemble. Indeed, amphiphilic molecules, such as the DOTAU, can form supramolecular objects like micelles or liposomes, which can be used to deliver DNA, antisense oligonucleotides, or siRNA directly into the cells.⁹ Because of their similarity to the lipid bilayer of cell membranes, these molecules are expected to cross the plasma membrane without the need for membrane transporters. Considering the benefit of nanoemulsions (NEs) as vehicles for therapeutic agents to target the brain,^{13–15} their combination with NLs, as a potential absorption promoter,

seemed to be a tantalizing approach to improve the passage of the BBB.

Oil-in-water (O/W) NEs, made of submicrometric oily droplets stabilized by a corona of amphiphilic surfactants, present enhanced stability compared to other nanosystems and high loading capacity of hydrophobic drugs or imaging probes.^{13,16–18} Very recently it has also been reported that some NLs, such as an NL radiotracer, were successfully able to permeate the BBB,¹⁹ suggesting that NLs could be promising absorption promoters. In this work, original NEs associated with nucleolipids were developed to enhance the membrane-crossing properties for therapeutic purposes and particularly in the context of neurodegenerative diseases. Indeed, previous studies have shown that both nanoparticles and NEs loaded with an acidic cargo made of poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) were able to induce neuroprotective effects, and following a systemic injection, NEs were able to cross the BBB.^{20,21}

Received: November 23, 2019

Accepted: February 12, 2020

Published: March 12, 2020

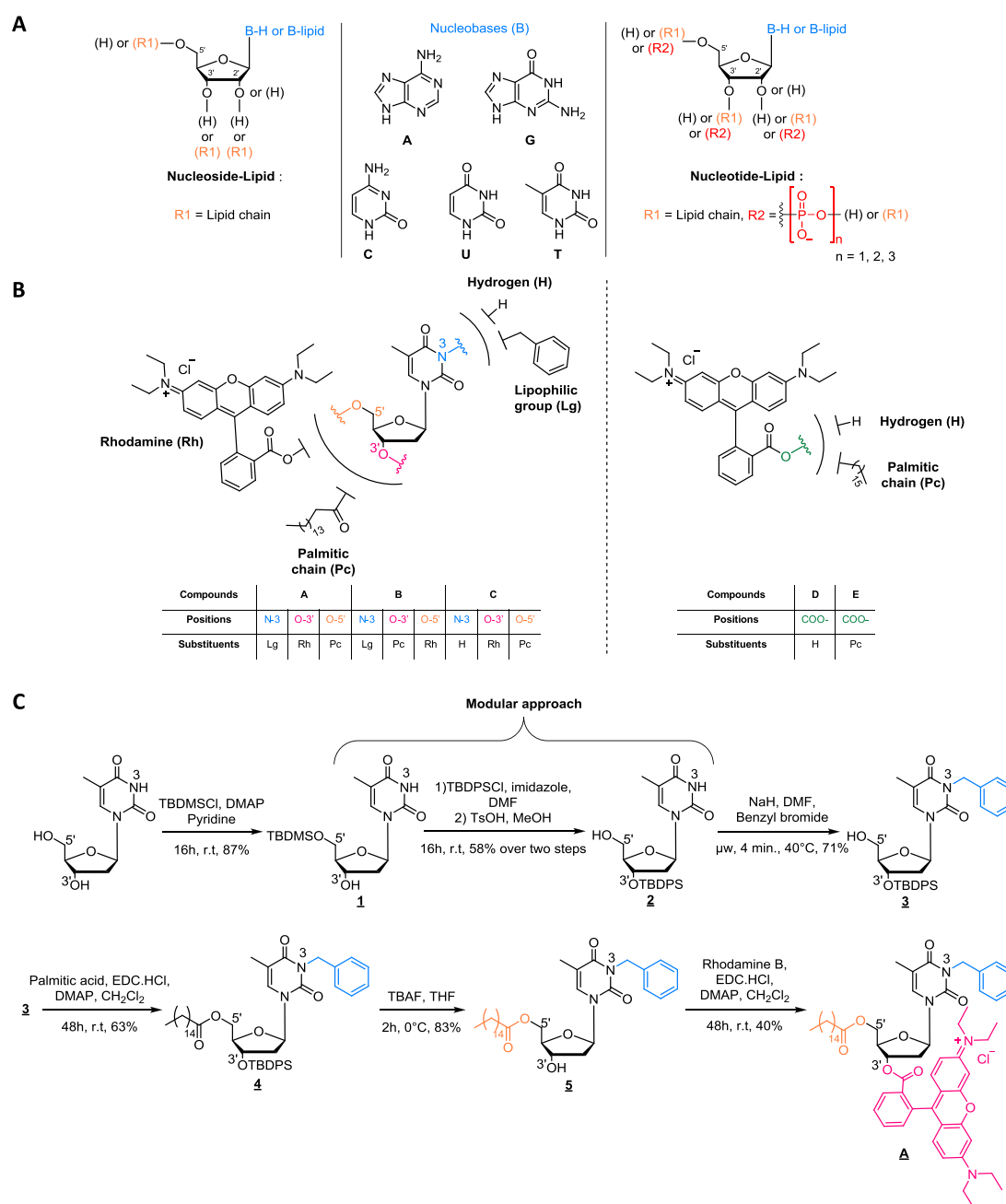


Figure 1. (A) General structure of nucleolipids. (B) Chemical structure of the different compounds synthesized for this study. (C) Synthetic sequence leading to NL-A.

Herein, we report the design and synthesis of original NLs and their formulation into NEs to cross the plasma membrane. We show the contributing role of NEs in the uptake and internalization of NLs into neuronal cells *in vitro*, and colocalization of NLs with lysosome was observed. These results suggest that lysosomes can be efficiently targeted by the use of these nanotechnology-based systems for drug delivery to treat brain diseases, in particular, neurodegenerative diseases, where lysosomal impairment occurs, among others.^{22,23}

RESULTS AND DISCUSSION

Design and Synthesis of Nucleolipidic Platforms. Six compounds, of which three were original NLs (Figure 1A), were then designed, synthesized, and biologically evaluated. Commercially available thymidine was used as a nucleosidic

platform, and key positions were conveniently functionalized step-by-step (Figure 1B). A benzyl group was introduced at the N-3 position of thymidine to enhance the lipophilicity of the compound and allow solubilization in the oily phase to provide an NE formulation later on. The first NL, compound A, was substituted with a palmitic chain at the 5' position and a rhodamine B fluorophore at position 3'. In NL compound B, the lipid chain and rhodamine B positions were switched. Thereby, these two lipophilic NLs were formulated into NEs, to carry out *in vitro* biological assays and evaluate the role of NLs, as well as the positions of the different substituents and their influence on the uptake into cells. The third NL (compound C) has been similarly designed by removing the benzyl group to make it water-soluble and investigate the role of NE itself. The last three compounds were used as a control.

Table 1. Composition of Loaded NEs with Compound A, B, D, or E and the Unloaded NE (NE-O)^a

NEs' composition	NE-O	NE-A	NE-B	NE-D	NE-E
miglyol 812	20%	20%	20%	20%	20%
lecithin E80	1.2%	1.2%	1.2%	1.2%	1.2%
tween 80	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%
compound's mass (mg)	0	10	10	5	7.5
quantity of compounds (mmol)	0	9.7×10^{-3}	9.7×10^{-3}	1.0×10^{-2}	1.1×10^{-2}
water q.s.	100	100	100	100	100

^aThe amounts of miglyol, lecithin, and tween are expressed in % (w/w).

Compound **D** was rhodamine B, one formulated in an NE and solubilized in water, to determine the role of the NEs, and compound **E** was a rhodamine–lipid conjugate (Figure 1B). Compound **E** was designed to compare its internalization into neuronal cells with that of compound **A** and investigate the benefits of using an NL rather than a simple lipid chain.

Nucleolipids **A** and **B** were prepared in seven- and five-step sequences, respectively. The first step was selective protection of the nucleoside to functionalize, thereafter, either position 3' or 5'. A benzyl group was added on the thymidine N-3 position by a simple alkylation following a procedure, using microwave activation, previously developed in the laboratory.²⁴ An esterification reaction between palmitic acid and thymidine was performed at the free hydroxyl positions (position 5' for compound **A** and position 3' for compound **B**). The protective group was then cleaved before a subsequent esterification step with the rhodamine B moiety (Figure 1C). Compound **C** was obtained through a six-step sequence, while compound **E** required a unique esterification step.

Nanoemulsion Preparation and Characterization. The lipidic nature and plasticity of O/W NEs make them suitable intravenous (iv) systems for drug delivery. NEs exhibit good encapsulation ability for hydrophobic drugs and efficiently improve their stability, IV tolerance, and bioavailability.²⁵ Five nanoemulsions were formulated with medium chain triglyceride oil Miglyol 812N as the oily phase and two surfactants polysorbate 80 (Tween 80) and egg phospholipids (Lecithin E80) (Table 1). NE-A, NE-B, NE-D, and NE-E were loaded, respectively, with nucleolipids **A** and **B**, rhodamine (**D**), and the rhodamine–lipid conjugate (**E**). An unloaded NE named NE-O was used as a control.

Physicochemical analysis of the formulations by dynamic light scattering (DLS) showed that all five formulations had a submicrometric size range (Table 2). All formulations

Table 2. Physicochemical Characteristics of Unloaded and Loaded NEs

NEs' characteristics	NE-O	NE-A	NE-B	NE-D	NE-E
diameter (nm)	180.9	178.6	146.2	186.7	181.3
polydispersity index	0.167	0.177	0.140	0.181	0.183
ζ-potential (mV)	−32.3	+56.1	+35.6	−37.1	+48.8

displayed a monodispersed distribution with a dispersity below 0.2. Zetameter measurements showed a negative ζ-potential for the control formulation (NE-O). Indeed, this negative charge is linked with the lecithin E80 surfactant (a mixture of phospholipids including negatively charged phospholipids). Interestingly, NE-A and NE-B were found to exhibit a positive ζ-potential. The same phenomenon was observed for NE-E, the rhodamine–lipid-based NE, which is also naturally positively charged. Contrariwise, a negative ζ-

potential was found with the rhodamine B-based formulation (NE-D) because non-lipid-conjugated rhodamine was solubilized in the oil phase at a final concentration of 25 mg/mL, suggesting that in this case, rhodamine B was placed inside the oily droplet and not at its surface (Figure 2).

Finally, the colloidal stability of three of these NEs was monitored in dynamic light scattering (DLS) to assess the size of the globules and the index of polydispersity.²⁶ Moreover, the ζ-potential was measured using a zetameter (Figure 2B). Satisfactorily, all formulations proved to remain monodispersed with a mean diameter under 200 nm for at least 14 days, and their ζ-potential was consistent over the same time. Moreover, NE-A, NE-D, and NE-E when assessed for longer times were found to be stable over 30 days.

In Vitro Cytotoxicity Evaluation of Nucleolipid-Loaded Nanoemulsions. Six formulations have been used in vitro to evaluate their respective cytotoxicity on human neuroblastoma cell lines (BE (2)-M17 cells) for either 24 or 48 h. These are the four NEs prepared (NE-A, NE-B, NE-D, and NE-E) and two aqueous formulations of compounds **C** and **D** (**C**: NL without the benzyl group and **D**: rhodamine B). After 24 or 48 h of exposure, no significant toxicity was observed, except for formulations Aq-D and NE-E (in the range of 20–36%) (Figure 3).

Role of NL-Loaded NEs for Internalization into Lysosomes in Vitro. As previously mentioned, lysosomal impairment is a common factor in neurodegenerative diseases. Lysosomes are intracellular acidic compartments that contain hydrolytic enzymes involved in the degradation of intracellular components through several degradation pathways, including endocytosis, phagocytosis, and autophagy.^{26,27} Therefore, to determine if these NE–NL nanovectors can be used as a drug-delivery system for neuronal cells, cellular uptake and lysosomal colocalization of the different compounds, labeled with rhodamine B, were investigated (Figure 4). Foremost, it has been observed that compounds/formulations NE-A, NE-B, NE-E, and Aq-C were well internalized into cells, while only 12 and 6% cellular uptake was observed for formulations NE-D and Aq-D, respectively. One possible explanation regarding the low rate of internalization of NE-D and Aq-D might be the leakage of free rhodamine outside the oily droplet of the NE, preventing the NE from fully serving its carrier function. Nevertheless, an uptake of 100% was obtained for the two NLs and the rhodamine–lipid conjugate loaded into NEs (**A**, **B**, or **E**), and it was found that the rate of NL internalized into cells was greatly enhanced with the use of NE. Indeed, we observed that only 50% of Aq-C, solubilized in water, get through plasma membranes (Figures 4 and 5). Furthermore, each of these compounds labeled with rhodamine (red) colocalized into lysosomes (LAMP2, green).

Consequently, the combination of nanoemulsions with properly substituted nucleolipids **A** and **B** provided efficient

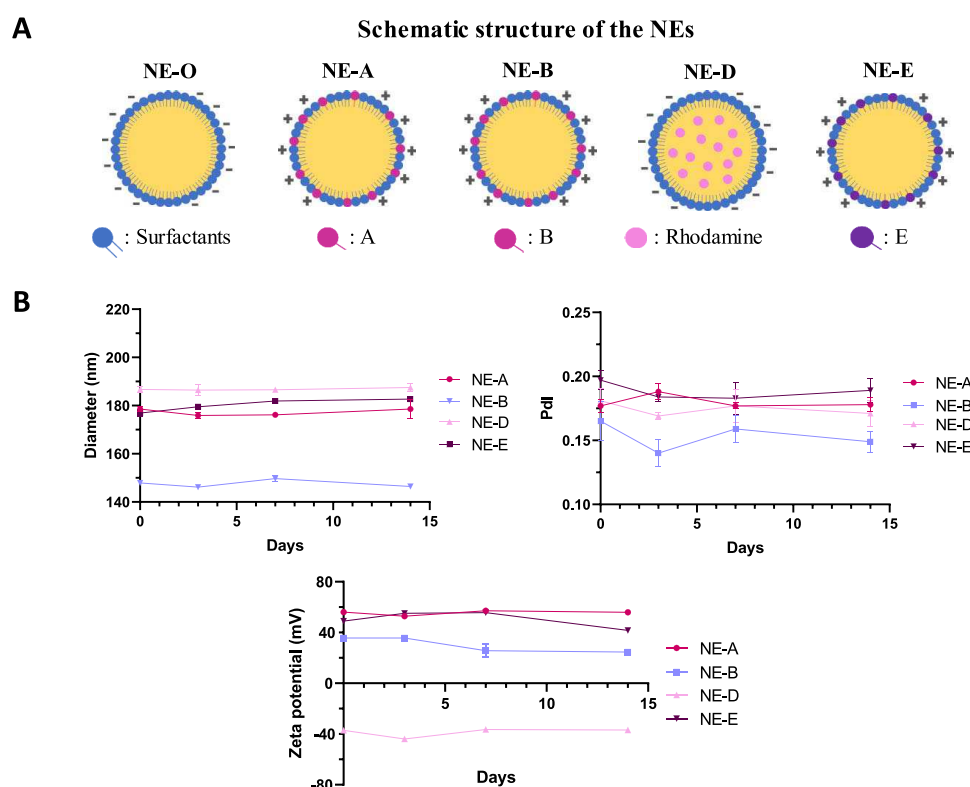


Figure 2. Physicochemical characteristics of unloaded and loaded NEs. (A) Schematic structure of the different NEs. (B) Evolution of the diameter, polydispersity index (PDI), and ζ -potential of NE-A, NE-D, and NE-E over time.

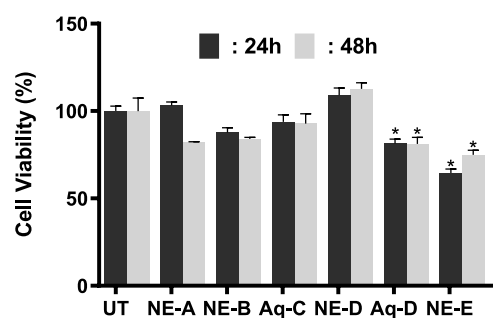


Figure 3. Cell viability evolution over time. BE (2)-M17 cells treated with NE-A, NE-B, NE-D, and NE-E and compounds C and D solubilized in water compared to the control condition (UT) after 24 and 48 h. * $p < 0.05$ compared with untreated cells.

and nontoxic nanovectors for neuronal cells' internalization and subsequent lysosome colocalization.

CONCLUSIONS

We proposed the synthesis of original thymidine-derived NLs bearing the fluorophore rhodamine B to study their biocompatibility and their role as a promoter of absorption to cross biological membranes. First, we designed lipophilic NLs to afford solubilization into the oily phase of O/W NE. Then, the lipidic chains on the sugar moiety and the benzyl group were substituted on the thymine amino group, allowing the formulation of NLs into NEs. The colloidal stability of this NL–NE system was monitored over time by DLS and ζ -potential analysis before carrying out in vitro experiments. Cytotoxicity evaluation of NL–NE complexes on human neuronal cells showed that NLs are fully biocompatible after 24 and 48 h of exposure, while other amphiphilic compounds,

such as rhodamine–lipid conjugates, display cellular toxicity. Evaluations of uptake into cells indicate that NL–NE systems are successfully internalized, highlighting the contribution of NEs as drug-delivery vehicles. More importantly, these original NLs bearing a fluorophore moiety are colocalized with lysosomes, suggesting that these nanotechnology-based systems can also be efficient tools to target lysosomes, whose impairment has been involved in neurodegenerative diseases. Therefore, these results were promising and pave the way to test, in future studies, and improve these new NL–NE systems for drug delivery in vivo, offering the possibilities for specific therapeutic solutions targeting pathologies associated with lysosomal impairment.

EXPERIMENTAL SECTION

General Information. All reactions were carried out under an argon atmosphere. Yields refer to chromatographically and spectroscopically (^1H NMR) homogeneous materials, unless otherwise stated. All reagent-grade chemicals were obtained from commercial suppliers and were used as received, unless otherwise stated.

^1H NMR and ^{13}C NMR were recorded on a Bruker Avance 300 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75.46 MHz) spectrometer using residual CHCl_3 as an internal reference (7.26 ppm) and at 293 K unless otherwise indicated. The chemical shifts (δ) and coupling constants (J) are expressed in ppm and Hz, respectively. The following abbreviations were used to explain the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, and b = broad. Fourier transform infrared (FT-IR) spectra were recorded on a PerkinElmer FT spectrometer Spectrum two (UATR two). For electrospray ionization (ESI) high-resolution mass spectrometry (HRMS) analyses, a Waters Micromass ZQ instrument equipped with an

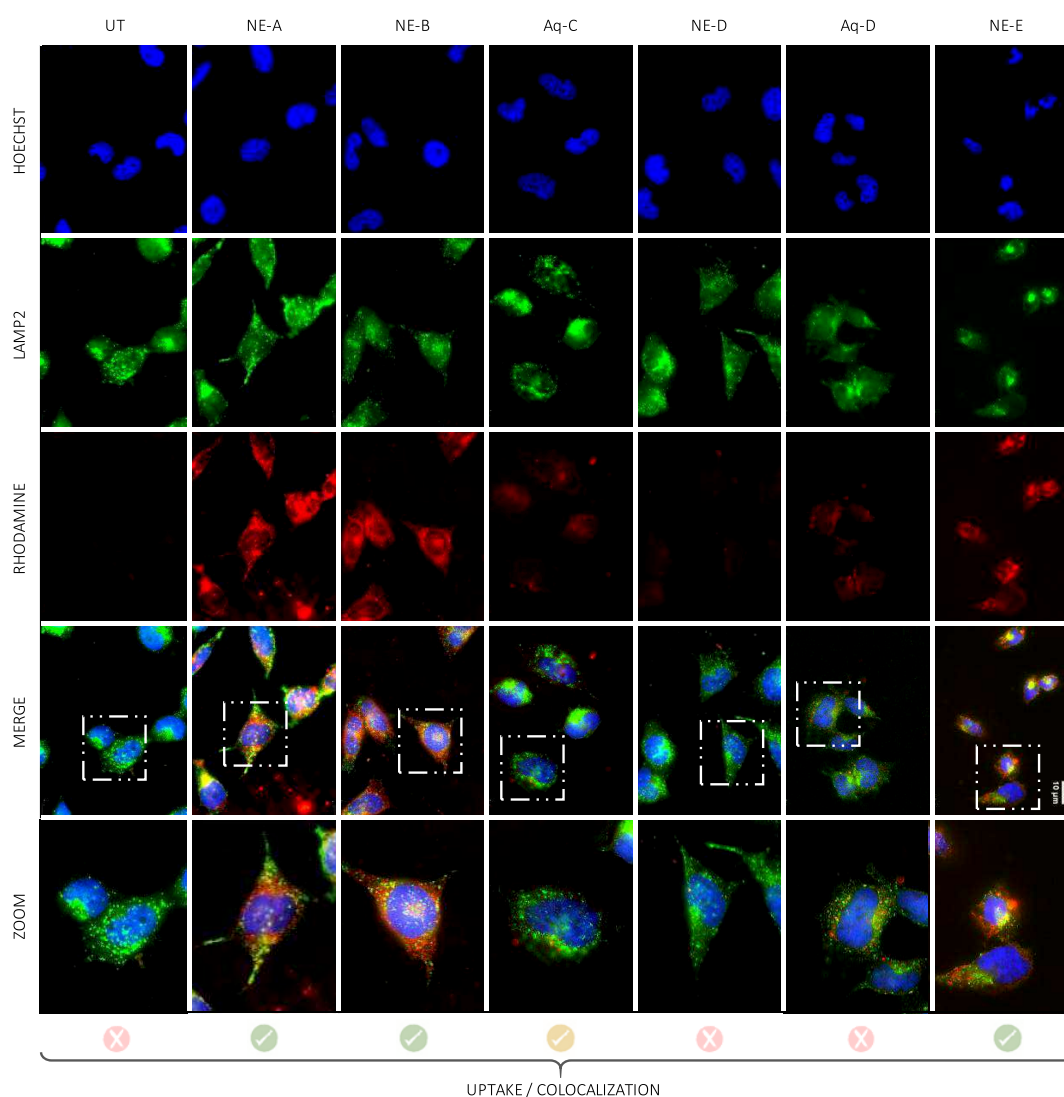


Figure 4. In vitro biological assessment. Epifluorescence microscopy pictures showing uptake and colocalization into BE (2)-M17 cells treated with compounds A, B, D, and E formulated into NEs and compounds C and D solubilized in water. Nuclei were stained with Hoechst (blue), lysosomes were stained with LAMP2 (green), and compounds A–E are highlighted by the presence of rhodamine B (red). Scale bar: 10 μm .

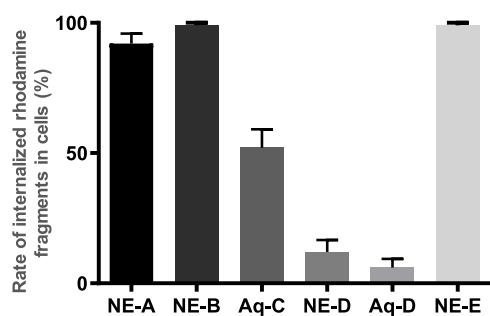


Figure 5. Quantification of internalized rhodamine in treated cells to evaluate uptake into BE (2)-M17 cells of compounds A, B, D, and E formulated into NEs and compounds C and D solubilized in water.

electrospray source was used in the positive and/or negative mode. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometric analyses were performed on a PerSeptive Biosystems Voyager-De Pro MALDI mass spectrometer in the linear mode using 3,4-dihydroxybenzoic acid as the matrix. Analytical thin-layer chromatography was

performed using silica gel 60 F254 precoated plates (Merck) with visualization by ultraviolet light, potassium permanganate, or sulfuric acid. Flash chromatography was performed on a silica gel (0.043–0.063 mm).

Procedure for Compound (A) Synthesis. *Synthesis of Compound 1.* To a solution of thymidine (1 equiv, 6 g, 24.77 mmol) in pyridine (118 mL) and under argon are sequentially added *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) (1.2 equiv, 4.48 g, 29.72 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (spatula tip). The mixture is stirred overnight at room temperature until completion of reaction. The reaction is then quenched by the addition of NaHCO_3 (10 mL, aq.) and diluted with water (10 mL). The aqueous phase was extracted three times with dichloromethane (DCM) (3×30 mL), and the combined organic phases are dried over Na_2SO_4 before concentration to dryness under vacuum. The resulting crude is purified by flash chromatography on a silica gel (pentane/EtOAc, 70/30) to obtain the expected compound **1** as a white powder (7.68 g, 21.55 mmol, 87%). NMR data are consistent with the literature. R_f : 0.24 (pentane/EtOAc, 70/30). IR

(ATR) ν (cm^{-1}): 3549, 3167, 2929, 2855, 1696, 1471, 1257, 1120, 832, 779.

Synthesis of Compound 2. First, to a solution of **1** (1 equiv, 14.7 g, 41.21 mmol) in dimethylformamide (DMF) (88 mL) and under argon are sequentially added imidazole (1.2 equiv, 3.37 g, 49.54 mmol) *tert*-butylchlorodiphenylsilane (TBDPSCI) (1.2 equiv, 12.88 mL, 49.54 mmol). The mixture is stirred overnight at room temperature until completion of reaction. The mixture is then diluted with toluene (100 mL), and DMF is coevaporated under vacuum to obtain a yellow oil. The oil is diluted in diethyl ether (10 mL), and the white precipitate formed is filtered and washed with an aqueous solution of NaCl. The organic phase is dried over Na_2SO_4 before concentration to dryness under vacuum. **1'** was obtained as a yellow oil. Second, to a solution of **1'** in methanol (80 mL) and under argon is added *para*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.471 g, 2.477 mmol). The mixture is stirred overnight at room temperature until completion of reaction. The methanol is then evaporated under vacuum to obtain a yellow oil. The crude product is diluted with EtOAc (30 mL) and the organic phase is washed three times with NaHCO_3 (10 mL, aq.) and brine (3 \times 20 mL). The organic phase is dried over Na_2SO_4 before concentration to dryness under vacuo. The resulting crude is purified by flash chromatography on a silica gel (petroleum ether/EtOAc, 50/50) to obtain the expected compound (**2**) as a white powder (6.90 g, 14.36 mmol, 58% over two steps). R_f : 0.29 (petroleum ether/EtOAc, 50/50). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.18 (bs, 1H, NH), 7.59–7.69 (m, 4H, H Ar), 7.34–7.50 (m, 6H, H Ar), 7.30 (d, J = 1.2 Hz 1H, H_6), 6.26 (dd, J = 6.0 Hz, 7.8 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 4.41–4.48 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 3.94–4.00 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3.62 (dd, J = 2.4 Hz, 12.0 Hz, 1H, $\text{H}_{5b'}$), 3.24 (dd, J = 3.0 Hz, 12.3 Hz, 1H, $\text{H}_{5a'}$), 2.43 (bs, 1H, OH), 2.26 (ddd, J = 3.0 Hz, 6.0 Hz, 13.2 Hz, 1H, $\text{H}_{2b'}$), 2.04–2.22 (m, 1H, $\text{H}_{2a'}$), 1.82 (d, J = 1.2 Hz, 3H, H_7), 1.08 (s, 9H, ^tBu). ^{13}C NMR (75.46 MHz, CDCl_3) δ ppm: 164.0 (C_4), 150.5 (C_2), 136.9 (C_6), 135.8 (CH Ar), 133.4 (Cq Ar), 133.3 (Cq Ar), 130.2 (CH Ar), 130.2 (CH Ar), 128.0 (CH Ar), 111.0 (C_5), 87.8 (C_4'), 86.6 (C_1'), 73.1 (C_3'), 62.1 (C_5'), 40.4 (C_2'), 27.0 (CH_3 ^tBu), 19.1 (Cq ^tBu), 12.5 (C_7). IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2932, 1682, 1471, 1274, 1104, 1031, 740, 702.

Synthesis of Compound 3. To a solution of **2** (1 equiv, 1 g, 2.08 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) and under an argon atmosphere, NaH (1.2 equiv, 0.135 g, 3.37 mmol) is added in a vial before activation in a microwave oven (2 min, 40 $^\circ\text{C}$, 200 W). Then, benzyl bromide (1.2 equiv, 0.4 mL, 3.37 mmol) is added, and the reaction mixture is placed in a microwave oven using a temperature control mode (4 min, 40 $^\circ\text{C}$, 200 W). DMF is then coevaporated with toluene, and the resulting crude is purified by flash chromatography on a silica gel (petroleum ether/AcOEt, 70/30) to obtain a white powder **3** (0.846 g, 1.48 mmol, 71%). R_f : 0.26 (petroleum ether/EtOAc, 70/30). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.61–7.69 (m, 4H, H Ar), 7.36–7.51 (m, 8H, H Ar), 7.21–7.35 (m, 4H, H_6 and H Ar), 6.28 (appearing t, J = 6.6 Hz, 5.2 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 5.11 (m, 2H, H_8), 4.41–4.49 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 3.94–4.00 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3.62 (dd, J = 2.1 Hz, 11.7 Hz, 1H, $\text{H}_{5b'}$), 3.23 (dd, J = 2.9 Hz, 12.0 Hz, 1H, $\text{H}_{5a'}$), 2.29 (ddd, J = 2.3 Hz, 4.9 Hz, 13.1 Hz, 1H, $\text{H}_{2b'}$), 2.08–2.33 (m, 1H, $\text{H}_{2a'}$), 1.89 (d, J = 0.9 Hz, 3H, H_7), 1.48–1.70 (bs, 1H, OH), 1.10 (s, 9H, ^tBu). ^{13}C NMR (75.46 MHz, CDCl_3) δ ppm: 163.5 (C_4), 151.1 (C_2), 136.9 (C_6), 135.9 (CH Ar), 134.9 (CH Ar), 133.4 (CH Ar), 133.2 (CH Ar), 130.2 (CH Ar), 129.3 (CH Ar), 128.5 (CH Ar),

128.0 (CH Ar), 127.7 (CH Ar), 110.5 (C_5), 87.7 (C_1' or C_4'), 87.5 (C_1' or C_4'), 73.1 (C_3'), 62.3 (C_5'), 44.6 (C_8), 40.4 (C_2'), 27.0 (CH_3 ^tBu), 19.2 (Cq ^tBu), 13.4 (C_7). IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3456, 3071, 2932, 2859, 1666, 1634, 1428, 1240, 1103, 1024, 741, 700.

Synthesis of Compound 4. To a solution of **3** (1 equiv, 0.160 g, 2.80×10^{-1} mmol) in DCM (1.6 mL) and under argon are sequentially added palmitic acid (1.2 equiv, 0.086 g, 3.36×10^{-1} mmol), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)·HCl (1 equiv, 0.052 g, 2.71×10^{-1} mmol), and DMAP (0.3 equiv, 0.010 g, 8.40×10^{-2} mmol). The mixture is stirred for 48 h at room temperature until completion of the reaction. The reaction is then quenched by the addition of NH_4Cl (5 mL, aq.) and diluted with water (10 mL). The aqueous phase is extracted three times with DCM (3 \times 10 mL), and the combined organic phases are dried over Na_2SO_4 before concentration to dryness under vacuum. The resulting crude is purified by flash chromatography on a silica gel (pentane/AcOEt, 90/10) to obtain compound **4** (0.138 g, 1.70×10^{-1} mmol, 63%) as a white foam. R_f : 0.20 (pentane/EtOAc, 90/10). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.62–7.75 (m, 4H, H Ar), 7.23–7.54 (m, 11H, H Ar), 7.19 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H_6), 6.50 (dd, J = 6.0 Hz, 7.5 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 5.16 (q, J = 13.8 Hz, 2H, H_8), 4.24–4.33 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 4.08–4.15 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3.94 (dd, J = 3.0 Hz, 12.0 Hz, 1H, $\text{H}_{5b'}$), 3.80 (dd, J = 4.2 Hz, 12.0 Hz, 1H, $\text{H}_{5a'}$), 2.43 (ddd, J = 2.5 Hz, 5.5 Hz, 13.2 Hz, 1H, $\text{H}_{2b'}$), 2.23 (t, J = 7.5 Hz, 2H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$ lipid), 1.94 (s, 3H, H_7), 1.77–1.90 (m, 1H, $\text{H}_{2a'}$), 1.48–1.61 (m, 2H, CH_2 lipid), 1.26–1.28 (m, 24H, CH_2 lipid), 1.14 (s, 9H, ^tBu), 0.93 (m, 3H, CH_3 lipid). ^{13}C NMR (75.46 MHz, CDCl_3) δ ppm: 172.9 ($\text{C}=\text{O}$), 163.2 (C_2), 150.8 (C_4), 136.9 (Cq Ar), 135.7 (CH Ar), 135.7 (CH Ar), 133.0 (CH Ar), 132.9 (CH Ar), 132.8 (C_6), 130.2 (Cq Ar), 130.2 (CH Ar), 129.1 (CH Ar), 128.3 (CH Ar), 128.0 (CH Ar), 127.9 (CH Ar), 127.5 (Cq Ar), 110.3 (C_5), 85.6 (C_1'), 84.7 (C_4'), 73.0 (C_3'), 63.2 (C_5'), 44.5 (C_8), 40.8 (C_2'), 34.0 (CH_2 lipid), 31.9 (CH_2 lipid), 29.7 (CH_2 lipid), 29.7 (CH_2 lipid), 29.6 (CH_2 lipid), 29.6 (CH_2 lipid), 29.4 (CH_2 lipid), 29.4 (CH_2 lipid), 29.2 (CH_2 lipid), 29.1 (CH_2 lipid), 26.9 (CH_3 ^tBu), 24.7 (CH_2 lipid), 22.7 (CH_2 lipid), 19.0 (Cq ^tBu), 14.1 (CH_3 lipid), 13.4 (C_7). IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3333, 2925, 2854, 1743, 1704, 1668, 1648, 1463, 1271, 1106, 1026, 700, 613, 506. HRMS (ESI) [$\text{M} + \text{H}^+$]: calcd = 809.49194, found = 809.49210.

Synthesis of Compound 5. To a solution of **4** (1 equiv, 0.326 g, 4.03×10^{-1} mmol) in tetrahydrofuran (THF) (4.54 mL) and under argon is added tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) (1 M in THF, 0.403 mL) at 0 $^\circ\text{C}$. The mixture is stirred for 2 h at 0 $^\circ\text{C}$. The reaction is then quenched by the addition of water (5 mL), and the mixture is warmed to room temperature before the addition of DCM (10 mL). The aqueous phase is extracted three times with DCM (3 \times 10 mL), and the combined organic phases are dried over Na_2SO_4 before concentration to dryness under vacuum. The resulting crude is purified by flash chromatography on a silica gel (pentane/AcOEt, gradient 90/10 to 70/30) to obtain the expected compound **5** (0.190 g, 3.33×10^{-1} mmol, 83%). R_f : 0.31 (pentane/EtOAc, 92/8). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.39–7.48 (m, 2H, H Ar), 7.18–7.35 (m, 4H, H Ar and H_6), 6.32 (appearing t, J = 6.3 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 5.11 (s, 2H, H_8), 4.21–4.41 (m, 3H, H_3' , $\text{H}_{5b'}$ and $\text{H}_{5a'}$), 4.13 (bs, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3.56–3.81 (bs, 1H, OH), 2.29–2.46 (m, 3H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$ lipid and $\text{H}_{2b'}$), 2.00–2.13 (m, 1H, $\text{H}_{2a'}$), 1.96 (s, 3H, H_7), 1.56–1.71 (m, 2H, CH_2 lipid), 1.27 (m, 24H, CH_2 lipid),

0.85–0.93 (m, 3H, CH₃ lipid). ¹³C NMR (75.46 MHz, CDCl₃) δ ppm: 173.6 (C=O), 163.4 (C₂), 150.9 (C₄), 136.7 (Cq Ar), 133.4 (C₆), 128.8 (CH Ar), 128.4 (CH Ar), 127.6 (CH Ar), 110.3 (C₅), 85.8 (C₁'), 84.3 (C₄'), 71.3 (C₃'), 63.7 (C₅'), 44.5 (C₈), 40.5 (C₂'), 34.2 (CH₂ lipid), 31.9 (CH₂ lipid), 29.7 (CH₂ lipid), 29.6 (CH₂ lipid), 29.5 (CH₂ lipid), 29.4 (CH₂ lipid), 29.2 (CH₂ lipid), 29.1 (CH₂ lipid), 24.9 (CH₂ lipid), 22.7 (CH₂ lipid), 14.1 (CH₂ lipid), 13.4 (CH₃ lipid). IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3363, 2918, 2850, 1697, 1621, 1470, 1178, 1092, 711. HRMS (ESI) [M + H⁺]: calcd = 571.37416, found = 571.37405.

Synthesis of Compound A. To a solution of **5** (1 equiv, 0.190 g, 3.33 × 10⁻¹ mmol) in DCM (1.9 mL) and under argon are sequentially added rhodamine B (1.2 equiv, 0.191 g, 3.99 × 10⁻¹ mmol), EDC·HCl (1 equiv, 0.062 g, 3.23 × 10⁻¹ mmol), and DMAP (0.3 equiv, 0.012 g, 9.99 × 10⁻² mmol) were sequentially added. The mixture is stirred for 48 h at room temperature. The reaction is then quenched by the addition of NH₄Cl (5 mL, aq.) and diluted with water (10 mL). The aqueous phase is extracted three times with DCM (3 × 10 mL), and the combined organic phases are dried over Na₂SO₄ before concentration to dryness under vacuum. The resulting crude is purified by flash chromatography on a silica gel (DCM/MeOH, 95/5) to obtain the expected compound **A** as a purple powder (0.132 g, 1.28 × 10⁻¹ mmol, 40%). *R*_f: 0.24 (DCM/MeOH, 95/5). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8.24–8.34 (d, *J* = 30.9 Hz, 1H, H Ar), 7.80 (dt, *J* = 7.5 Hz, 14.7 Hz, 30.3 Hz 2H, H Ar), 7.31–7.41 (m, 2H, H Ar), 7.13–7.30 (m, 5H, H₆ and H Ar), 7.09–6.86 (m, 4H, H Ar), 6.74 (bs, 2H, H Ar), 5.08–6.08 (m, 1H, H₁'), 5.09–5.15 (m, 1H, H₃'), 5.01–5.02 (d, *J* = 3.0, 2H, H₈), 4.08–4.24 (m, 2H, H₅'), 3.90–3.98 (m, 1H, H₄'), 3.50–3.66 (m, 8H, CH₂–CH₃ rhodamine), 2.04–2.28 (m, 4H, H₂' and O=C–CH₂ lipid), 1.86 (s, 3H, H₇'), 1.40–1.52 (m, 2H, CH₂ lipid), 1.07–1.32 (m, 36H, CH₂ lipid and CH₂–CH₃ rhodamine), 0.79 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃ lipid). ¹³C NMR (75.46 MHz, CDCl₃) δ ppm: 172.8 (C=O), 164.1 (CH Ar), 163.0 (C₂), 157.5 (Cq Ar or CH Ar), 155.4 (Cq Ar or CH Ar), 155.5 (CH Ar), 155.5 (CH Ar), 150.7 (C₄), 136.6 (C₆), 133.6 (CH Ar), 133.4 (CH Ar), 131.4 (CH Ar), 130.9 (CH Ar), 130.9 (CH Ar), 130.4 (CH Ar), 130.3 (CH Ar), 128.7 (CH Ar), 128.2 (CH Ar), 127.4 (CH Ar), 114.5 (Cq Ar), 113.2 (C₅), 110.5 (Cq Ar), 96.3 (CH Ar), 85.7 (C₁'), 81.8 (C₄'), 75.5 (C₃'), 63.5 (C₅'), 46.1 (CH₂–CH₃ rhodamine), 44.3 (CH₂ lipid), 31.7 (C₂'), 29.5 (CH₂ lipid), 29.5 (CH₂ lipid), 29.4 (CH₂ lipid), 29.2 (CH₂ lipid), 29.2 (CH₂ lipid), 29.1 (CH₂ lipid), 28.9 (CH₂ lipid), 24.6 (CH₂–CH₃ rhodamine), 22.5 (CH₂ lipid), 13.9 (CH₂ lipid), 13.2 (CH₂ lipid), 12.6 (C₇). IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3333, 2923, 2852, 1716, 1704, 1647, 1586, 1465, 1412, 1336, 1272, 1246, 1178, 1131, 1072, 923, 682. HRMS (ESI) [M⁺]: calcd = 995.58924, found = 995.58830.

General Procedure for NE Preparation. Lipoid E80 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany) was dispersed in heated (i.e., 70 °C) oil phase Miglyol 812N (IOI Oleo GmbH, Hamburg, Germany) using ultrasound delivered by a sonication bath. Once the dispersion was complete, 1 × 10⁻⁵ mol of the compound (**A**, **B**, **D**, or **F**) was solubilized in oil and surfactant mixture. Hydrophilic surfactant Tween 80 (SEPPIC, Paris, France) was dispersed in the heated (i.e., 70 °C) water phase (Milli-Q water). Emulsification was observed on adding the water phase to the oil phase thanks to the phase-inversion method. Homogenization was performed using a sonication probe (Sonic Vibra Cell-VC 250) for 10 min to obtain

submicron size range oil droplets. Prior to in vitro experiments, formulation osmolality was adjusted with the addition of glycerol (Coopération pharmaceutique française) at 2% and pH was adjusted close to the physiological value using sodium hydroxide 0.1 N.

NE Characterization and Stability. Granulometric profiles of NE were characterized by dynamic light scattering (DLS) using Malvern Instruments (Zetasizer Nano ZS). NEs were diluted 1:1000 (v/v), and the average size and the polydispersity index were determined by three independent measurements performed at 25 °C. To analyze the ζ-potential, NEs were diluted 1:1000 (v/v) and measurements were performed using Zetasizer Nano ZS coupled with a folded capillary cell (DTS1060) from Malvern Instruments. Short-term stability assessment of the NE was performed for 1 month by checking the lack of visual creaming or phase separation and by checking the granulometric profiles and ζ-potential.

Cell Culture and Cell Viability Assay. Cell lines BE (2)-M17 (human neuroblastoma) were obtained from ATCC (CRL-2267) and grown in OPTIMEM (Life Technologies, 31985-047) by adding 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin/streptomycin. For all experiments, freshly prepared NE solutions were used and cells were grown at 70–80% confluence. Cells were treated for 24 or 48 h with 0.5 μL of loaded NE. Each experiment was reproduced at least three times. Cell viability was estimated by the MTS assay (ATCC/LGC Promochem) following the manufacturer's instructions.

Immunostaining and Imaging. For all experiments, NE solutions were freshly prepared. For loaded-NE internalization and colocalization imaging assays, cells were trypsinized and replated in 6-well plates (NUNC) with coverslips. BE (2)-M17 cells were grown at 70–80% confluence per well. Once cells were attached, they were exposed for 24 h at 37 °C to the different loaded nanoemulsions. All nanoemulsions were added at a final concentration of ~50 μg/mL. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4 °C and then washed with phosphate-buffered saline (PBS). Cell permeabilization and blocking steps were realized by the addition of a mixture composed of 5 mL of PBS, 450 μL of normal goat serum, and 225 μL of triton. Lysosomes were marked with the LAMP2 (Mx, H4B4) antibody overnight at 4 °C, and staining was revealed with the appropriate secondary antibody conjugated with GAM 488 (Life Technologies). For cytoplasm and nucleus staining, the cells were incubated for 8 min at room temperature with 8 μM Hoechst dye (ThermoFisher Scientific, #3342) prior to mounting. Slices were air-dried and mounted on #1.5 coverslips with Dako fluorescent mounting medium and left to dry overnight in darkness.

Image stacks (pixel size ~100 nm, z-step 0.3 μm) were acquired on a laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP8 microscope, Leica Microsystems) using a 63X Plan Apo CS oil immersion objective. Rhodamine B was detected using an excitation wavelength of 568 nm (DPSS laser) and with a detection window between 570 and 590 nm. Lysosomes were detected using an excitation wavelength of 488 nm (argon laser) and with a detection window between 545 and 605 nm. Cells without loaded-nanoemulsion treatments were used in parallel as autofluorescence controls using the corresponding excitation and detection wavelengths. Images were analyzed with LAS AF v2.6 acquisition software equipped with an HCS-A module (Leica Microsystems). Rhodamine B intensity relative to the cell surface was quantified with Definiens XD Developer v2.5 software (Definiens). Colocalization, fluores-

cence profiles, orthogonal projections, and maximal intensity projections were obtained with the ImageJ (NIH) distribution Fiji.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism 6 software. For functional assays, statistical significance of the data was evaluated after one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.9b03992>.

Synthetic procedures and characterization of compounds 1–10, A–C, and E (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Benjamin Dehay – Université de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33076 Bordeaux, France; CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, Centre Broca Nouvelle-Aquitaine, 33076 Bordeaux, France; orcid.org/0000-0003-1723-9045; Email: benjamin.dehay@u-bordeaux.fr

Valérie Desvergnès – Université de Bordeaux, INSERM, U1212, CNRS UMR 5320, ARNA, ARN: Régulations Naturelle et Artificielle, ChemBioPharm, 33076 Bordeaux, France; orcid.org/0000-0003-0290-8875; Email: valerie.desvergnès@u-bordeaux.fr

Authors

Anthony Cunha – Université de Bordeaux, INSERM, U1212, CNRS UMR 5320, ARNA, ARN: Régulations Naturelle et Artificielle, ChemBioPharm, 33076 Bordeaux, France; Université de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33076 Bordeaux, France; CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, Centre Broca Nouvelle-Aquitaine, 33076 Bordeaux, France

Geoffrey Prévot – Université de Bordeaux, INSERM, U1212, CNRS UMR 5320, ARNA, ARN: Régulations Naturelle et Artificielle, ChemBioPharm, 33076 Bordeaux, France; orcid.org/0000-0002-5191-9784

Yannick Mousli – Université de Bordeaux, INSERM, U1212, CNRS UMR 5320, ARNA, ARN: Régulations Naturelle et Artificielle, ChemBioPharm, 33076 Bordeaux, France

Philippe Barthélémy – Université de Bordeaux, INSERM, U1212, CNRS UMR 5320, ARNA, ARN: Régulations Naturelle et Artificielle, ChemBioPharm, 33076 Bordeaux, France; orcid.org/0000-0003-3917-0579

Sylvie Crauste-Manciet – Université de Bordeaux, INSERM, U1212, CNRS UMR 5320, ARNA, ARN: Régulations Naturelle et Artificielle, ChemBioPharm, 33076 Bordeaux, France

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.9b03992>

Author Contributions

A.C. and G.P. contributed equally to this work. A.C., G.P., and Y.M. carried out the experiments. P.B., S.C.-M., V.D., and B.D. designed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. P.B. provided critical tools and reagents. P.B. and

B.D. secured the funding. All authors have read and approved the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fondation de France Grant number 00066525 and an IDEX Emergence Grant number OPE-2018-410 (B.D.). A.C. is a recipient of a MSER fellowship (France). G.P. has been supported by a MSER fellowship and the Fondation de France. The LABEX Brain, the University of Bordeaux, and the Center National de la Recherche Scientifique provided infrastructural support.

■ REFERENCES

- (1) Furtado, D.; Björnmalm, M.; Ayton, S.; Bush, A. I.; Kempe, K.; Caruso, F. Overcoming the Blood–Brain Barrier: The Role of Nanomaterials in Treating Neurological Diseases. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, No. 1801362.
- (2) Teleanu, D. M.; Negut, I.; Grumezescu, V.; Grumezescu, A. M.; Teleanu, R. I. Nanomaterials for Drug Delivery to the Central Nervous System. *Nanomaterials* **2019**, *9*, No. 371.
- (3) Cho, C. F.; Wolfe, J. M.; Fadzen, C. M.; Calligaris, D.; Hornburg, K.; Chiocca, E. A.; Agar, N. Y. R.; Pentelute, B. L.; Lawler, S. E. Blood-Brain-Barrier Spheroids as an in Vitro Screening Platform for Brain-Penetrating Agents. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, No. 15623.
- (4) Teleanu, D. M.; Chircov, C.; Grumezescu, A. M.; Teleanu, R. I. Neuronanomedicine: An up-to-Date Overview. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, No. 101.
- (5) Tang, W.; Fan, W.; Lau, J.; Deng, L.; Shen, Z.; Chen, X. Emerging Blood-Brain-Barrier-Crossing Nanotechnology for Brain Cancer Theranostics. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 2967–3014.
- (6) Baillet, J.; Desvergnès, V.; Hamoud, A.; Latxague, L.; Barthélémy, P. Lipid and Nucleic Acid Chemistries: Combining the Best of Both Worlds to Construct Advanced Biomaterials. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, No. 1705078.
- (7) Takatsuki, A.; Tamura, G. Tunicamycin, a New Antibiotic. II. Some Biological Properties of the Antiviral Activity of Tunicamycin. *J. Antibiot.* **1971**, *24*, 224–231.
- (8) Awasthi, N.; Zhang, C.; Schwarz, A. M.; Hinz, S.; Wang, C.; Williams, N. S.; Schwarz, M. A.; Schwarz, R. E. Comparative Benefits of Nab-Paclitaxel over Gemcitabine or Polysorbate-Based Docetaxel in Experimental Pancreatic Cancer. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 2361–2369.
- (9) Chabaud, P.; Camplo, M.; Payet, D.; Serin, G.; Moreau, L.; Barthélémy, P.; Grinstaff, M. W. Cationic Nucleoside Lipids for Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 466–472.
- (10) van Tiel, F. H.; Boere, W. A.; Harmsen, T.; Kraaijeveld, C. A.; Snippe, H. Determination of Inhibitory Concentrations of Antiviral Agents in Cell Culture by Use of an Enzyme Immunoassay with Virus-Specific, Peroxidase-Labeled Monoclonal Antibodies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 802–805.
- (11) Riccardi, C.; Musumeci, D.; Irace, C.; Paduano, L.; Montesarchio, D. Ru^{III} Complexes for Anticancer Therapy: The Importance of Being Nucleolipidic. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 1100–1119.
- (12) Simeone, L.; Mangiapia, G.; Irace, C.; Di Pascale, A.; Colonna, A.; Ortona, O.; De Napoli, L.; Montesarchio, D.; Paduano, L. Nucleolipid Nanovectors as Molecular Carriers for Potential Applications in Drug Delivery. *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 3075–3086.
- (13) Prévot, G.; Kauss, T.; Lorenzato, C.; Gaubert, A.; Larivière, M.; Baillet, J.; Laroche-Traïneau, J.; Jacobin-Valat, M. J.; Adumeau, L.; Mornet, S.; et al. Iron Oxide Core Oil-in-Water Nanoemulsion as Tracer for Atherosclerosis MPI and MRI Imaging. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532*, 669–676.
- (14) Prokhorov, D. I.; Sariev, A. K.; Abramov, D. A.; Voronina, T. A.; Kapitsa, I. G.; Zhuravko, A. S.; Shiriaeva, M. V.; Kaplun, A. P.;

Seifulla, R. D. Experimental Investigation of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Carbamazepine Nanoemulsion. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2014**, *157*, 742–746.

(15) Kumar, S.; Ali, J.; Baboota, S. Design Expert Supported Optimization and Predictive Analysis of Selegiline Nanoemulsion via the Olfactory Region with Enhanced Behavioural Performance in Parkinson's Disease. *Nanotechnology* **2016**, *27*, No. 435101.

(16) Jaiswal, M.; Dudhe, R.; Sharma, P. K. Nanoemulsion: An Advanced Mode of Drug Delivery System. *3 Biotech* **2015**, *5*, 123–127.

(17) Gonzales, J.; Kossatz, S.; Roberts, S.; Pirovano, G.; Brand, C.; Pérez-Medina, C.; Donabedian, P.; de la Cruz, M. J.; Mulder, W. J. M.; Reiner, T. Nanoemulsion-Based Delivery of Fluorescent PARP Inhibitors in Mouse Models of Small Cell Lung Cancer. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 3776–3782.

(18) Gianella, A.; Jarzyna, P. A.; Mani, V.; Ramachandran, S.; Calcagno, C.; Tang, J.; Kann, B.; Dijk, W. J. R.; Thijssen, V. L.; Griffioen, A. W.; et al. Multifunctional Nanoemulsion Platform for Imaging Guided Therapy Evaluated in Experimental Cancer. *ACS Nano* **2011**, *5*, 4422–4433.

(19) Swastika; Chaturvedi, S.; Kaul, A.; Hazari, P. P.; Jha, P.; Pal, S.; Lal, S.; Singh, B.; Barthélémy, P.; Mishra, A. K. Evaluation of BBB Permeable Nucleolipid (NLDPU): A Di-C15-Ketalised Palmitone Appended Uridine as Neuro-Tracer for SPECT. *Int. J. Pharm.* **2019**, *565*, 269–282.

(20) Prévot, G.; Soria, F. N.; Thiolat, M. L.; Daniel, J.; Verlhac, J. B.; Blanchard-Desce, M.; Bezdard, E.; Barthélémy, P.; Crauste-Manciet, S.; Dehay, B. Harnessing Lysosomal PH through PLGA Nanoemulsion as a Treatment of Lysosomal-Related Neurodegenerative Diseases. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 4083–4089.

(21) Bourdenx, M.; Daniel, J.; Genin, E.; Soria, F. N.; Blanchard-Desce, M.; Bezdard, E.; Dehay, B. Nanoparticles Restore Lysosomal Acidification Defects: Implications for Parkinson and Other Lysosomal-Related Diseases. *Autophagy* **2016**, *12*, 472–483.

(22) Dehay, B.; Martinez-Vicente, M.; Caldwell, G. A.; Caldwell, K. A.; Yue, Z.; Cookson, M. R.; Klein, C.; Vila, M.; Bezdard, E. Lysosomal Impairment in Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* **2013**, *28*, 725–732.

(23) Bonam, S. R.; Wang, F.; Muller, S. Lysosomes as a Therapeutic Target. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2019**, *18*, 923–948.

(24) Hamoud, A.; Barthélémy, P.; Desvergnés, V. An Organocatalyzed Stetter Reaction as a Bio-Inspired Tool for the Synthesis of Nucleic Acid-Based Bioconjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 1760–1769.

(25) Piorowski, D. T.; McClements, D. J. Beverage Emulsions: Recent Developments in Formulation, Production, and Applications. *Food Hydrocolloids* **2014**, *42*, 5–41.

(26) Luzio, J. P.; Pryor, P. R.; Bright, N. A. Lysosomes: Fusion and Function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 622–632.

(27) Lübke, T.; Lobel, P.; Sleat, D. E. Proteomics of the Lysosome. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **2009**, *1793*, 625–635.

Titre : Conception, synthèse et formulation de nucléolipides originaux pour le ciblage de neurones d'intérêt dans le cadre de la maladie de Parkinson

Résumé : Cette thèse a porté sur le développement de nouveaux vecteurs thérapeutiques pour le traitement de la maladie de Parkinson. La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui se caractérise notamment par la présence d'inclusions protéiques intracytoplasmiques appelées « corps de Lewy ». L'une des causes de la formation de ces « corps de Lewy », principalement composés d' α -synucléine, serait l'atteinte du système autophagie-lysosome, nécessaire à la dégradation des composants cellulaires. Le rétablissement des fonctions de l'autophagie constitue donc une cible thérapeutique intéressante pour lutter contre la maladie de Parkinson. Une approche interdisciplinaire a permis de travailler sur les diverses étapes de la recherche à visée thérapeutique, de la synthèse chimique de substances actives à leur nano-formulation, puis à l'évaluation biologique de ces nanovecteurs. Premièrement, les propriétés biologiques de restauration du pH lysosomal des nanoparticules de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) ont été étudiées. Cette première partie a permis de conclure que ces nanoparticules possédaient une activité neuroprotectrice, tout en améliorant la synucléinopathie et un rétablissement de la fonction lysosomale chez un modèle murin de la maladie de Parkinson. Deuxièmement, l'effet thérapeutique d'une substance active reconnue comme neuroprotectrice, le tréhalose, a été évalué *in-vitro* sur une lignée cellulaire (BE (2)-M17), notamment pour sa capacité d'activation de l'autophagie. Des dérivés nucléolipide-tréhalose (appelés GlycoNucléoLipides ou GNL) ont donc été développés et synthétisés avant leur encapsulation à l'intérieur de nanoparticules de PLGA. Ces GNL ont également montré leur capacité d'auto-assemblage pour former des nanoparticules solides lipidiques (appelées SLN) capables, comme leurs analogues de PLGA, de traverser les membranes cellulaires et d'induire une activation de l'autophagie.

Mots clés : nucléolipides, nanoparticules, maladie de Parkinson, autophagie, thérapeutique

Title: Design, synthesis and formulation of novel nucleolipids for the targeting of neurons of interest in Parkinson's disease

Abstract: This PhD work focused on the development of new therapeutic vectors for the treatment of Parkinson's disease. Parkinson's disease is a neurodegenerative disease characterized by the presence of proteinaceous intracytoplasmic inclusions called "Lewy bodies", mainly composed of α -synuclein. One of the causes for their formation may rely on the impairment of the autophagy-lysosomal pathway. Therefore, the restoration of autophagic function constitutes an interesting therapeutic target against Parkinson's disease. An interdisciplinary approach enabled to work on the various stages of research for therapeutic purposes, from the chemical synthesis of active substances to their nanoformulation, and then to the biological evaluation of these nano-vectors. First, the restoration of the lysosomal pH by poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles was investigated. This first part allowed concluding that these nanoparticles bear a neuroprotective activity, associated with a synucleinopathy reduction and a restoration of autophagy in a mouse model of Parkinson's disease. Secondly, the effect of a neuroprotective active substance, trehalose, was evaluated *in-vitro* on a neuronal cell line (BE (2)-M17), notably on the activation of the autophagy-lysosomal pathway. Nucleolipid-trehalose derivatives (called GlycoNucleoLipids or GNL) were developed and synthesized before their encapsulation in PLGA nanoparticles. These GNLs demonstrated their ability to self-assemble into solid lipid nanoparticles (called SLN) capable, like their PLGA analogues, of crossing cell membranes and of inducing the autophagic flux.

Keywords: nucleolipids, nanoparticles, Parkinson's disease, autophagy, therapeutic

Unité de recherche

ARNA ARN : Régulation Naturelle et Artificielle, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, Université de Bordeaux,
Bâtiment Pharmacie, 3ème tranche, 4ème étage, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

-
Institut des Maladie Neurodégénératives, UMR CNRS 5293,
146 rue Léo Saignat, Batiment 3B 1^{er} étage, 33076 Bordeaux Cedex