THESE DE DOCTORAT

NNT : 2026UPASQ031

# Administration d'une formulation d'anticorps trastuzumab par voie intranasale afin de cibler les métastases cérébrales HER2-positives. Approches in vitro et in vivo.

*Nose-to-brain delivery of a trastuzumab antibody formulation to target HER2-positive brain metastases. In vitro and in vivo approaches.*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n°569, Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Sciences pharmacologiques
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans le **Laboratoire d'Etude de l'Unité Neurovasculaire & Innovation Thérapeutique (Université Paris Saclay, CEA, LENIT)**, sous la direction de **Didier BOQUET**, directeur de recherche CEA et la co-direction de **Aloïse MABONDZO**, directeur de recherche CEA.

**Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 26 octobre 2026, par**

**Léa KENGNE KAMKUI**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

| | |
|---|---|
| **Hervé HILLAIREAU**<br>professeur, Université Paris Saclay | Examinateur |
| **Karine ANDRIEUX**<br>professeur, Université Paris-Cité | Rapporteur & Examinatrice |
| **Samar ISSA** professeur des universités, EBI | Rapporteur & Examinateur |
| **Guilhem BOUSQUET** professeur Université Sorbonne Paris Nord, Hôpital Avicenne, Unité de recherche SynKoMIC | Examinateur |
| **Sophie RICHARD**<br>MCU – Université Claude Bernard Lyon 1 | Examinatrice |

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué (ITFA)

**Titre :** Approche par voie intranasale au moyen d'une formulation adaptée d'un anticorps thérapeutique pour le traitement des métastases cérébrales

**Mots clés :** barrière hémato-encéphalique ; métastases cérébrales ; cancer du sein HER2-positif ; trastuzumab ; administration intranasale ; nanoparticule PLGA

**Résumé :** Le développement de traitements efficaces contre les maladies cérébrales reste un défi majeur en raison de la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui limite l'accès des médicaments au cerveau. Cette limitation est particulièrement importante pour les anticorps thérapeutiques, dont la taille restreint leur biodisponibilité cérébrale après administration systémique. Les métastases cérébrales du cancer de sein HER 2 positif illustrent cette problématique. Bien que le trastuzumab ait considérablement amélioré la prise en charge des cancers de seins HER2 positifs et le contrôle des métastases extra-crâniennes, son faible passage à travers la BHE limite son efficacité au niveau cérébral. La voie nasale constitue ainsi une approche non invasive prometteuse, permettant un transport direct des médicaments vers le cerveau via les voie olfactives et trigéminales. Cette approche reste toutefois limitée par le faible volume administrable, la clairance mucociliaire et la dégradation enzymatique.

L'objectif de cette thèse était de développer une formulation de trastuzumab adaptée à l'administration intranasale afin d'améliorer le passage vers le cerveau pour le traitement des métastases cérébrales du cancer du sein HER2-positif. Pour ce faire, le trastuzumab a été encapsulé dans des nanoparticules de poly (acide lactique-co-glycolique) (PLGA), un polymère biocompatible et biodégradable. Plusieurs paramètres de formulation ont été évalués afin d'obtenir des nanoparticules d'une taille inférieure à 200 nm, présentant une bonne efficacité d'encapsulation et une capacité de charge compatible avec l'administration intranasale. La formulation initiale obtenue présentait un rayon hydrodynamique d'environ 100 nm, une efficacité d'encapsulation de 57 % et une capacité de charge de 1,14 %. Son évaluation sur un modèle in vitro d'épithélium nasal humain (RPMI 2650), a permis d'augmenter d'un facteur neuf le transport du trastuzumab à travers l'épithélium par rapport au trastuzumab libre, tout en préservant sa fonctionnalité.

Une seconde phase d'optimisation a permis d'améliorer considérablement la formulation. Un mélange de stabilisants (PVA/Poloxamer 188), a conduit à une efficacité d'encapsulation d'environ 90 % et à une capacité de charge moyenne de 5,6 %, réduisant ainsi le volume nécessaire à l'administration intranasale. Bien que cette formulation présente une libération initiale rapide (burst release), elle constitue une base solide pour un développement ultérieur. Parallèlement, une formulation du fragment Fab du trastuzumab a été développée afin d'explorer une stratégie complémentaire susceptible d'améliorer encore davantage le passage vers le cerveau. Enfin, des études de biodistribution in vivo ont été initiées chez la souris.

Ainsi, ces travaux ont abouti au développement d'une formulation de nanoparticules de PLGA adaptée à l'administration intranasale du trastuzumab et en ont démontré le potentiel à l'aide d'un modèle in vitro. Les travaux ultérieurs porteront sur l'analyse d'études in vivo, l'optimisation du profil de libération et l'évaluation de l'efficacité thérapeutique dans un modèle de métastases cérébrales. Ces travaux constituent une preuve de concept prometteuse pour le développement d'une stratégie d'administration de la voie nasale vers le cerveau généralisable à d'autres anticorps thérapeutiques.

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique
du fondamental à l'appliqué
(ITFA)

**Title:** Intranasal approach using an adapted formulation of a therapeutic antibody for the treatment of brain metastases

**Keywords:** blood-brain barrier; brain metastases; HER2-positive breast cancer; trastuzumab; intranasal administration; PLGA nanoparticle

**Abstract:** The development of effective treatments for brain diseases remains a major challenge due to the presence of the blood-brain barrier (BBB), which limits the access of drugs to the brain. This limitation is particularly significant for therapeutic antibodies, whose size restricts their bioavailability in the brain following systemic administration. Brain metastases from HER2-positive breast cancer illustrate this problem. Although trastuzumab has significantly improved the management of HER2-positive breast cancers and the control of extracranial metastases, its limited penetration across BBB limits its efficacy in the brain. The nasal route thus represents a promising noninvasive approach, allowing for the direct delivery of drugs to the brain via the olfactory and trigeminal pathways. However, this approach remains limited by the small volume that can be administered, mucociliary clearance, and enzymatic degradation.

The aim of this thesis was to develop a trastuzumab formulation suitable for intranasal administration to improve brain penetration for the treatment of brain metastases from HER2-positive breast cancer. To achieve this, trastuzumab was encapsulated in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles, a biocompatible and biodegradable polymer. Several formulation parameters were evaluated to obtain nanoparticles smaller than 200 nm, with good encapsulation efficiency and a loading capacity compatible for intranasal administration. The initial formulation obtained had a hydrodynamic radius of approximately 100 nm, an encapsulation efficiency of 57%, and a loading capacity of 1.14%. Its evaluation in an in vitro human nasal epithelium model (RPMI 2650) resulted in a ninefold increase in trastuzumab transport across the epithelium compared to free trastuzumab, while preserving its functionality.

A second optimization phase led to a significant improvement in the formulation. A mixture of stabilizers (PVA/Poloxamer 188) resulted in an encapsulation efficiency of approximately 90% and an average loading capacity of 5.6%, thereby reducing the volume required for intranasal administration. Although this formulation exhibits rapid initial release (burst release), it provides a solid foundation for further development. At the same time, a formulation of the trastuzumab Fab fragment was developed to explore a complementary strategy that could further improve penetration into the brain. Finally, in vivo biodistribution studies have been initiated in mice.

In summary, this research led to the development of a PLGA nanoparticle formulation suitable for the intranasal administration of trastuzumab and demonstrated its potential using an in vitro model. Future work will focus on analyzing in vivo studies, optimizing the release profile, and evaluating therapeutic efficacy in a model of brain metastases. This work represents a promising proof of concept for the development of a nasal delivery strategy to the brain that can be generalized to other therapeutic antibodies.

# REMERCIEMENTS

Au terme de ces années de thèse, je voudrais exprimer ma profonde gratitude envers les personnes qui m'ont accompagnée, soutenue et encouragée tout au long de cette aventure. Ces années ont été riches en apprentissages, aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Je garderai le souvenir de toutes les personnes qui ont contribué à faire de cette expérience une étape aussi importante de ma vie.

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus sincères remerciements à Didier Boquet. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir offert l'opportunité de rejoindre ce projet dans le cadre d'un CDD et de poursuivre cette aventure en thèse. Merci pour ton encadrement sans faille, ta disponibilité, ta bienveillance et ton écoute, qui m'ont permis de donner le meilleur de moi-même tout au long de ces années. Je te remercie également de m'avoir laissé la liberté de m'exprimer, de proposer mes idées et de prendre les initiatives. Nos nombreuses heures de brainstorming resteront à jamais gravées dans ma mémoire. J'ai énormément appris à tes côtés. Tu m'as appris à mieux gérer les moments où les expériences ne se déroulaient pas comme prévu, à prendre du recul face aux résultats décevants et surtout à persévérer malgré les difficultés. Je te suis infiniment reconnaissante pour tout ce que tu m'as transmis, tant sur le plan scientifique qu'humain.

Je remercie également Aloïse Mabondzo pour son encadrement, ses conseils et son accompagnement tout au long de cette aventure. Je te suis très reconnaissante pour la confiance que tu m'as accordée, les nombreux échanges qui ont contribué à enrichir mon parcours au LENIT. Merci pour les opportunités que tu m'as offertes, notamment celles de participer à plusieurs congrès. Malgré tes nombreuses responsabilités et fonctions, ton bureau est toujours resté ouvert et tu as toujours trouvé du temps pour discuter d'un résultat.

Je souhaite remercier chaleureusement Dr Stéphanie Simon, cheffe du Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS) du CEA et cheffe du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, pour son accueil et sa bienveillance.

Je remercie l'agence nationale de la recherche (ANR - N2B 2024-28) et le contrat formation par la recherche (CFR) pour leur soutien financier pour ma dernière année de thèse.

Aux membres de mon jury, je tiens à exprimer ma sincère gratitude pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie tout particulièrement les professeures Karine Andrieux et Samar Issa d'avoir accepté d'être rapporteures de ce travail. Mes remerciements vont également à Dr Sophie Richard, au Pr Hervé Hillaireau et au Pr Guilhem Bousquet pour leurs participations en tant

qu’examinateurs. Merci pour l’intérêt porté à mes travaux, pour vos remarques constructives et pour la richesse de nos échanges lors de la soutenance.

Je remercie également Pr Marie-Claire Verdier-Julienne et Pr Saadia Kerdine-Römer membres de mon comité de suivi de thèse, pour leur disponibilité, leur écoute et leurs précieux conseils tout au long de ces années.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude au Pr Denis Wouessidjewe, qui a cru en mes capacités et m'a encouragée à poursuivre mes études alors que je terminais mon doctorat d'exercice en pharmacie. Il a su me guider et me donner confiance pour m'engager dans cette voie. Je lui suis infiniment reconnaissante pour ses conseils, sa bienveillance et pour le rôle de mentor qu'il continue de jouer dans mon parcours.

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet.

Narciso, merci pour la production des anticorps, mais aussi pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta bonne humeur. Un grand merci de m’avoir toujours « permis » de venir te *piquer* quelques petites choses sur ta paillasse lorsque j’en avais besoin.

Amaury, merci pour ta disponibilité et ton aide précieuse, particulièrement lors de mes expérimentations *in vivo*. Je te suis reconnaissante pour tout le temps que tu y as consacré, malgré tes nombreuses responsabilités.

Clémence, un grand merci de m’avoir formé sur le modèle *in vitro*. Merci pour cet accompagnement, tes conseils, ta disponibilité et surtout pour tous nos moments d’échange.

Anne-Cécile, un immense merci pour ta disponibilité et ta bienveillance. Tu as toujours été prête à interrompre ce que tu faisais pour venir me donner un coup de main. Tu m’as appris la rigueur, aussi bien en culture cellulaire que lors des expérimentations *in vivo*. Merci pour tes conseils et nos nombreuses discussions passionnantes.

J’adresse également mes sincères remerciements à toute l’équipe de CERES Brain Therapeutics : Clémence, Camille, Victoria, Henri et Thomas. Merci de m’avoir formée à la mise en place du modèle *in vitro* de l’épithélium nasal et pour tous les échanges enrichissants qui m’ont permis de mieux appréhender les aspects pratiques liés à l’application des formulations.

Dr Bertrand Collin, au Dr Franck Denat, au Dr Delphine Vivier et à Mégane Mekl, un grand merci pour les nombreuses discussions scientifiques et les échanges toujours enrichissants autour du projet. Merci tout particulièrement à Mégane pour avoir mis constamment à notre disposition le trastuzumab nécessaire à la réalisation de mes formulations.

Dr Hervé Bernard, un grand merci pour ta disponibilité et ta patience. Merci d'avoir toujours facilité mon accès aux équipements nécessaires à mes expériences, et tout particulièrement au lyophilisateur.

Nadine Zok, tu m'as rejointe presque à la fin de cette aventure et as rapidement pris les choses en main. Ton aide a été précieuse pour faire avancer les dernières expériences. Merci pour ton enthousiasme, ton efficacité et ta motivation. J'ai beaucoup apprécié ton sérieux, ton empathie et tous les bons moments partagés ensemble.

Dr Sharon Emline, je vous remercie de nous avoir permis de réaliser les analyses de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) sur nos échantillons au sein de votre laboratoire IRAMIS. Merci pour votre accueil, votre gentillesse, votre disponibilité et votre aide lors de la réalisation de ces analyses.

Dr Annamaria Quaranta, je vous remercie de nous avoir accueillis au sein de votre laboratoire I2BC pour la réalisation des analyses FTIR sur nos échantillons. Merci également pour votre disponibilité et pour le temps consacré à notre formation.

Dr Edmond Gravel, merci de nous avoir accueillis au SCBM pour la réalisation des mesures du potentiel zêta. Je vous remercie pour votre disponibilité ainsi que pour le temps consacré à nous former à l'utilisation de l'équipement.

Hervé Boutal, merci infiniment pour ta disponibilité et ta gentillesse. Tu as toujours été prêt à chercher des solutions aux difficultés que je pouvais rencontrer. Merci pour ta bienveillance et toutes nos discussions passionnantes et enrichissantes. J'ai beaucoup appris de nos échanges.

Émeline, Laëtitia et Aurélie, merci pour votre gentillesse et pour avoir toujours fait en sorte de me trouver un créneau pour utiliser la sonde à ultrasons.

Alexandra, merci pour ta gentillesse et tous les coups de main. Tu as toujours fait en sorte que le laveur de plaques et le matériel dont nous avions besoin soient disponibles. Merci pour toutes ces attentions qui m'ont facilité la tâche au laboratoire.

Je remercie également toutes les personnes du laboratoire et du LENIT que j'ai eu le plaisir de côtoyer. Merci pour votre accueil, vos conseils, nos échanges et tous les coups de main. Merci pour votre solidarité et tous les moments de rire partagés.

Marie, merci pour ton accueil dès mon arrivée au laboratoire et pour m'avoir initiée à la culture cellulaire et à la FACS. Tu as toujours été une oreille attentive, une personne vers qui je pouvais me tourner pour discuter ou me confier. Je te suis très reconnaissante pour ta bienveillance, ton soutien et tous tes encouragements. Merci pour tes précieux conseils. Merci également de m'avoir si souvent proposé de me déposer.

Iris, merci pour ta gentillesse, ton écoute, tes conseils, tes suggestions et ta disponibilité. Tu as également été une oreille attentive et tu m'as beaucoup encouragée tout au long de cette aventure. Je te suis très reconnaissante pour ton amitié, ta bienveillance, ta sincérité et ton authenticité.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude à la team des cadeaux, qui m'a accueillie avec beaucoup de bienveillance et m'a aidé à sortir progressivement de ma réserve. Merci pour votre soutien, aussi bien sur le plan professionnel que personnel, et pour tous les moments de partage qui ont rendu ces années encore plus belles.

Cyril et Eva, je suis très heureuse d'avoir partagé cette aventure avec vous dès le début. Merci pour votre soutien, votre amitié et tous les moments passés ensemble dans la bonne humeur. Cyril, merci pour ton écoute, tes conseils et toutes nos discussions passionnantes, même lorsqu'elles ne concernaient pas directement nos domaines respectifs. Avec toi, je ne me suis jamais ennuyée. Eva, merci pour ton extrême gentillesse, tes petites attentions et tes cadeaux réguliers. Tu as toujours su trouver les mots pour me remonter le moral. Merci pour tous nos moments de rigolade et pour ton coaching gratuit.

Amalia, merci pour ton énergie incroyable, ta bonne humeur, ton soutien, ta gentillesse et ta disponibilité sans faille. Tu as toujours trouvé le temps d'aider et d'organiser de petites attentions pour nous faire plaisir, même lorsque tu avais déjà beaucoup à faire. Merci pour ton aide précieuse pendant les expérimentations *in vivo*, pour tous les tips que tu as partagés avec moi et pour toutes tes attentions. Merci également pour tous nos fous rires. Je garde de très beaux souvenirs de tous ces moments passés ensemble.

Clara, je me souviens encore de ton arrivée au laboratoire, toute calme, installée à ton bureau au fond de l'open space. Je ne savais pas encore que, grâce à toi, j'allais découvrir le volley, qui a pris une place importante dans ma vie pendant ces années de thèse et encore aujourd'hui. Merci pour cette belle découverte, pour ton écoute et pour tous nos échanges, notamment autour des calculs parfois casse-tête de mes cinétiques. Je n'oublierai pas nos trajets ensemble, parfois accompagnées de Lola. Merci également de nous avoir si souvent proposé de nous déposer.

Nathan, merci d'avoir toujours répondu présent avec autant d'enthousiasme lorsque j'avais besoin d'un coup de main, que ce soit pour le plan d'expérience, Python ou ton assistance au laboratoire. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et, surtout, tous les moments de rire partagés.

Merci à vous tous pour votre bienveillance à mon endroit et pour m'avoir intégré pleinement au groupe même si mon second degré me faisait parfois défaut. Je suis heureuse d'avoir partagé cette aventure avec vous.

Lola, ma voisine de bureau et compagne de route, merci pour nos discussions, nos rires et ces petites pauses qui nous permettaient de relâcher la pression après des journées bien chargées.

Victoria, merci pour tous les moments partagés pendant nos pauses-café avec les petits rappels sur mon agenda et les petits messages sur mon calendrier qui vont me manquer.

Manon et Camille, même si nous n'avons pas eu beaucoup de temps pour partager ces années ensemble, je tiens à vous remercier pour votre gentillesse, votre disponibilité, ainsi que pour tous les conseils et astuces que vous avez partagés avec moi pendant la rédaction.

Auriane et Khadija, merci à toutes les deux pour votre disponibilité, votre gentillesse et vos précieux conseils chaque fois que j'ai fait appel à vous.

Romane, tu étais là dès mes débuts et merci pour tes encouragements constants et pour avoir toujours trouvé les mots justes pour me motiver « psipsi ».

Je tiens également à remercier chaleureusement ma famille, dont l'amour inconditionnel et le soutien m'ont été essentiels tout au long de cette aventure. Je dédie tout particulièrement ce travail à mon papa, qui m'a tant encouragée à entreprendre la thèse, mais qui nous a malheureusement quittés juste avant que je ne la débute. J'aurais tellement aimé que tu sois là pour voir l'aboutissement de ce travail et partager ce moment avec moi. Tu as toujours cru en moi et tes encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années. J'espère que, de là où tu es, tu es fier de moi. Ce travail, je te le dédie avec tout mon amour.

À ma maman, merci pour ton amour, ton soutien et tes prières sans lesquels cette aventure n'aurait pas été possible. Merci d'avoir toujours été présente malgré la distance et de m'avoir accompagnée, tout au long de ce parcours. À mes chers frères et sœurs, Aubin, Bruno, Yves, Hervé, Laure, Lynda, Carine et Brenda, merci pour tous ces longs appels qui m'ont permis de me sentir un peu moins loin de vous malgré la distance. Merci également d'être venus me rendre visite chaque fois que vous en avez eu la possibilité. Merci d'avoir été présents dans les moments de doute et de fatigue. Votre soutien m'a donné la force de continuer. Cette réussite est aussi la vôtre.

Je remercie également Carine et Roméo pour m'avoir accueillie à bras ouvert dès mon arrivée. Vous avez été un repère précieux toujours présent dans mes moments de joie comme pendant les épreuves. Merci pour votre attention, vos prières et votre générosité.

Je voudrais également remercier mes amies en or Cynthia, Rolande et Ingrid. Cela fait bientôt quinze ans que nous nous connaissons et je sais que je peux toujours compter

sur vous, malgré la distance. Merci pour votre soutien infaillible pendant toutes ces années, pour votre force, vos encouragements et votre présence.

Et à mon plus grand soutien, mon compagnon de vie. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi pendant cette période. Tu m'as toujours tirée vers le haut, encouragée et aidée à croire en moi, particulièrement durant cette dernière période de rédaction du manuscrit, qui n'a pas toujours été de tout repos et nous a parfois valu quelques nuits sans sommeil. Merci pour ton écoute, ta patience, ta compréhension et toutes les initiatives que tu as prises pour me faciliter la tâche et alléger cette période. « Nos chemins se sont croisés ici ». Merci pour ton soutien inconditionnel et tout ce que tu as fait pour moi. Et merci également à Dave, qui a suivi tes pas et bien entendu tes instructions jusqu'à ma soutenance !

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX ..... 19
LISTE DES FIGURES ..... 20
LISTE DES ABREVIATIONS ..... 23
INTRODUCTION GENERALE ..... 1
A. INTRODUCTION ..... 2
CHAPITRE 1 : METASTASES CEREBRALES HER2-POSITIVES ..... 5
A. GENERALITE SUR LES METASTASES CEREBRALES ..... 5
A.1 Epidémiologie et physiopathologie ..... 5
A.2 Cascade métastatique conduisant à la formation de métastases cérébrales ..... 8
B. PRISE EN CHARGE ACTUELLE DES METASTASES CEREBRALES DU CANCER DU SEIN HER2-POSITIF ..... 10
B.1 Traitements locaux ..... 11
B.2 Traitements systémiques ..... 11
CHAPITRE 2 : LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : UN DEFI DANS L'ADMINISTRATION CEREBRALE DE MEDICAMENTS ..... 15
A. LES DIFFERENTES BARRIERES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL ..... 15
A.1 La barrière Sang-LCR ou barrière hémato-liquidienne ..... 16
A.1.1 Le liquide cérébrospinal : composition et production ..... 16
A.1.2 Circulation du LCR ..... 17
A.1.3 Structure anatomique de la barrière sang-LCR ..... 17
A.2 La barrière arachnoïdienne ..... 19
A.3 La barrière hémato-encéphalique ..... 19
C. PHYSIOLOGIE ET ANATOMIE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE ..... 20
B.1. Structure /Organisation ..... 20
B.1.1 Les cellules endothéliale ..... 20
B.1.2 Les péricytes ..... 22
B.1.3 Les astrocytes ..... 22
B.1.4 Membrane basale ..... 23
B.1.5 Le glycocalyx ..... 23
B.2 Mécanisme de transports ..... 25

B.2.1 Mécanismes généraux ..... 25
B.2.2 Transport des macromolécules thérapeutiques ..... 26
B.2.3 Transport des immunoglobulines et le rôle du récepteur FcRn ..... 27
B.2.4 Application au trastuzumab ..... 29
C. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : UN FREIN A LA DISTRIBUTION CEREBRALE DES MEDICAMENTS ..... 30
C.1 Faible perméabilité cérébrale des médicaments ..... 30
C.2 la barrière hémato-encéphalique en conditions pathologiques ..... 31
CHAPITRE 3 : STRATEGIES EXISTANTES POUR AMELIORER LA BIODISTRIBUTION INTRACEREBRALE DES MEDICAMENTS ..... 34
A. MODIFICATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET/OU DE TRANSPORT DES MOLECULES THERAPEUTIQUES ..... 39
A.1 Approches physico-chimiques ..... 39
A.2 Approches biologiques ..... 40
A.3 Vectorisation dans les systèmes colloïdaux de délivrance de médicaments ..... 42
A.3.1 Définition et fonctions ..... 42
A.3.2 Différentes générations ..... 42
A.3.3 Nanovecteur pour le franchissement de la BHE ..... 44
A.3.4 Résultats des études précliniques et cliniques ..... 45
B. PERTURBATION TRANSITOIRE DE LA BHE ..... 47
B.1 Méthodes physiques d'ouverture transitoire de la BHE ..... 47
B.2 Méthodes chimiques d'ouverture transitoire de la BHE ..... 48
C. METHODES DE CONTOURNEMENT DE LA BHE ..... 50
C.1 Injection intra LCR ..... 50
C.2 Injections intraparenchymateuse ou utilisation d'implants ..... 53
CHAPITRE 4 : LA VOIE NASALE : UNE APPROCHE PROMETTEUSE POUR CONTOURNER LA BHE ..... 55
A. ANATOMIE DE L'INTERFACE « *NOSE TO BRAIN* » ..... 56
A.1 La région vestibulaire ..... 56
A.2 La région respiratoire ..... 57
A.3 La région olfactive ..... 57
A.4 Jonctions cellulaires ..... 58

A.5 Contraintes anatomiques de la voie « *nose-to-brain* » ..... 58
B. LES VOIES D'ACHEMINEMENTS DES MEDICAMENTS DU NEZ VERS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL ..... 60
B.1 La voie olfactive ..... 61
B.2 La voie trigéminale ..... 62
B.3 La voie systémique ..... 62
C. CONSIDERATIONS PHARMACOCINETIQUES DE LA DELIVRANCE N2B : FACTEURS D'EFFICACITE ET LIMITATIONS ..... 64
C.1 les propriétés physicochimiques de la molécule ..... 64
C.2 Concentration, dose et volume d'administration ..... 64
C.3 Muscus nasal ..... 65
C.4 Clairance mucociliaire de la muqueuse nasale et forme pharmaceutique ..... 66
C.5 Barrière enzymatique de la muqueuse olfactive ..... 67
C.6 Accessibilité de la région olfactive et dispositifs d'administration ..... 68
C.7 Position d'administration ..... 69
C.8 Impact de l'anesthésie dans les études précliniques ..... 69
D. AVANTAGES ET LIMITATIONS DE L'APPROCHE N2B ..... 71
E. STRATEGIES AMELIORANT L'ADMINISTRATION DE MEDICAMENTS PAR VOIE NASALE ..... 73
E.1 Modification chimique ou structurale des agents thérapeutiques ..... 73
E.2 Approche galénique ..... 74
E.2.1 Ajout d'adjuvants de formulation : promoteurs d'absorption, inhibiteurs enzymatiques ..... 74
F. MODELES EXPERIMENTAUX D'EVALUATION DE LA PERMEABILITE NASALE ..... 76
F.1 Modèles *in vitro* de l'épithélium nasale ..... 76
F.2 Modèles *ex vivo* de l'épithélium nasale ..... 77
F.3 Modèles *in vivo* ..... 78
CHAPITRE 5 : VECTORISATION DANS LES SYSTEMES COLLOÏDAUX POUR L'APPROCHE N2B ..... 81
A. GENERALITE SUR LES SYSTEMES COLLOÏDAUX POUR L'APPROCHE N2B ..... 81
A.1 Nanoparticules lipidiques ..... 82
A.1.1 Les liposomes ..... 82

A.1.2 Les nanoparticules lipidiques solides ..... 83
A.1.3 Les nanoparticules lipidiques nanostructurées ..... 83
A.2 Nanovecteurs polymériques ..... 84
A.2.1 le chitosane ..... 84
B. LES NANOPARTICULES DE PLGA ..... 86
B.1 Généralités et propriétés physicochimiques ..... 86
B.2 Méthodes de préparation ..... 88
B.2.1 Emulsion évaporation de solvant ..... 88
B.2.2 Nanoprécipitation ..... 89
B.2.3 le salting-out ..... 89
B.3 les Stabilisants ..... 90
B.4 Application des nanoparticules de PLGA en N2B ..... 90
C. CARACTERISTIQUES DES NANOVECTEURS QUI AFFECTENT L'APPROCHE N2B ..... 92
CHAPITRE 6 : FORMULATION DES ANTICORPS THERAPEUTIQUES ..... 94
A. GENERALITE SUR LES ANTICORPS MONOCLONAUX ..... 94
A.1 Généralité ..... 94
A.2 Structure et propriétés ..... 95
B. RATIONNEL DE LA FORMULATION DES ANTICORPS THERAPEUTIQUES ..... 97
B.1 principaux mécanismes de dégradation des anticorps ..... 97
B.1.1 Oxydation ..... 97
B.1.2 Désamidation ..... 98
B.1.3 Agrégation ..... 98
B.1.4 Fragmentation/hydrolyse ..... 99
D. PRINCIPALES STRATEGIES DE FORMULATION CONVENTIONNELLES POUR AMELIORER LA STABILITE DES ANTICORPS MONOCLONAUX ..... 100
C .1 Tampons et contrôle du pH ..... 100
C.2 Sucres et polyols : stabilisants thermodynamiques ..... 101
C.3 Tensioactifs : protection de l'interface ..... 101
C.4 Acides aminés : stabilisants multifonctionnels ..... 102
C.5 Autres excipients ..... 102
E. FORMULATIONS INNOVANTES DES ANTICORPS THERAPEUTIQUES ..... 103
D.1 Considérations générales ..... 103

D.2 Formats alternatifs ..... 104
D.3 Nanovectorisation ..... 105
RESUME DE L'ETAT DE L'ART ..... 107
OBJECTIFS ET DEMARCHES METHODOLOGIQUES ..... 109
RESULTATS DES TRAVAUX DE THESE ..... 111
I. DEVELOPPEMENT DE LA FORMULATION DE TRASTUZUMAB DANS LES NANOPARTICULES DE PLGA (ARTICLE) ..... 112
A. INTRODUCTION DE L'ETUDE ..... 112
B. MATERIELS ET METHODES ..... 116
B.1 Production et purification trastuzumab ..... 116
B.2 Caractérisation de la production et étude de stabilité, et de la stabilité après la libération des nanoparticules ..... 116
B.3 Dosage de TZB par ELISA ..... 118
B.4 Préparation des nanoparticules ..... 118
B.5 Caractérisation physicochimiques des nanoparticules ..... 120
B.5.1 Mesure de la taille, indice de polydispersité, potentiel zêta et morphologie 120
B.5.2 Evaluation de l'efficacité d'encapsulation (EE%) et de la capacité de chargement DL% en trastuzumab des formulations ..... 121
B.5.3 Évaluation de la cinétique de libération du TZB à partir de nanoparticules (NP) dans un tampon PBS, du mucus nasal ou du plasma ..... 122
C. RESULTATS ..... 123
C.1 Etude de stabilité ..... 123
C.1.1 Stabilité structurale ..... 123
C.1.2 Stabilité Fonctionnelle ..... 124
C.2 Formulation des Nanoparticules ..... 125
C.2.1 Influence du type de stabilisant ..... 126
C.2.2 Influence d'autres facteurs ..... 129
C.2.3 Influence de l'incorporation du trastuzumab sur les propriétés physico-chimiques et l'efficacité d'encapsulation ..... 130
C.2.4 Influence de la quantité de trastuzumab introduite et de la concentration de la solution mère utilisée sur les propriétés physico-chimiques et l'efficacité d'encapsulation ..... 131

C.3 Cinétique de libération du TZB à partir des formulations de nanoparticules....134
C.4 caractérisation de TZB libéré à partir des nanoparticules....136
D. DISCUSSION ET PERSPECTIVES....138
E. DONNEES SUPPLEMENTAIRES....143
II. EVALUATION *IN VITRO* (ARTICLE PUBLIE DANS PHARMACEUTICS MAI 2025)....149
A. INTRODUCTION....149
B. MATERIELS ET METHODES....150
B.1 Culture des cellules RPMI2650....150
B.2 Mise en place du modèle *in vitro* de l'épithélium nasal....150
B.3 Caractérisation et validation du modèle....150
B.4 Etude de l'influence des formulations sur l'intégrité de la barrière et la viabilité cellulaire....151
B.5 Etude de perméabilité....151
C. RESULTATS....153
C.1 Évaluation de l'influence de la formulation sur l'intégrité de l'épithélium nasal 153
C.2. Évaluation de la perméabilité du trastuzumab à travers le modèle d'épithélium nasal 154
C.3 Évaluation de la fonctionnalité du trastuzumab après passage à travers l'épithélium nasal....155
D. DISCUSSION ET PERSPECTIVES....158
III. ETUDES COMPLEMENTAIRES DE FORMULATION....160
A. INTRODUCTION....160
B. MATERIELS ET METHODES....162
B.1 Formulation des nanoparticules....162
B.2 Etude de la cinétique de libération....163
B.3 Caractérisation physicochimique....163
B.3.1 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)....163
B.3.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)....164
B.4 Étude préliminaire de la stabilité du Fab-TZB....164
C. RESULTATS....165

C.1 Formulation des TZB-NP : influence du type de stabilisant et de la concentration en PLGA sur la taille des nanoparticules ..... 165
C.1.1 Influence du type de stabilisant et du procédé de purification sur la taille des nanoparticules ..... 165
C.1.2 Caractérisation morphologique par microscopie électronique en transmission (MET) ..... 166
C.1.3 Influence du type de stabilisant et de la concentration de PLGA sur la distribution de taille des nanoparticules ..... 167
C.2 Formulation des TZB-NP : influence du type de stabilisant et de la concentration en PLGA sur l'efficacité d'encapsulation et la chargement en TZB des nanoparticules 168
C.3 Formulation des TZB-NP : influence du type de stabilisant et de la concentration en PLGA sur la libération de TZB à partir des NP ..... 172
C.4 Analyse par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ..... 176
C.5 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ..... 177
C.7 Formulation des nanoparticules de Fab-TZB ..... 179
C.7.1 Etude de stabilité du Fab-TZB dans les conditions de formulation ..... 179
C.7.2 Formulation et caractérisation de nanoparticules de PLGA chargées en Fab-TZB 180
D. DISCUSSION ET PERSPECTIVES ..... 187
E. DONNEES SUPPLEMENTAIRES ..... 193
IV. ÉVALUATION PRECLINIQUE *IN VIVO* DE LA FORMULATION ..... 195
A. INTRODUCTION DE L'ETUDE ..... 195
DISCUSSION GENERALE ..... 198
BIBLIOGRAPHIE ..... 205
ANNEXES ..... 236

# LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1:** Principaux essais cliniques évaluant les traitements des métastases cérébrales HER2+ du cancer du sein et leurs résultats intracrâniens.
**Tableau 2 :** Principaux essais cliniques en cours évaluant de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les métastases cérébrales du cancer du sein HER2+**.**
**Tableau 3:** Stratégies pour améliorer la biodisponibilité intracérébrale des molécules à faible passage de la BHE : avantages et inconvénients
**Tableau 4:** avantages de la voie nasale
**Tableau 5 :** limitations de la voie nasale
**Tableau 6 :** cahier des charges des formulation pour l'administration nasale pour une application N2B
**Tableau 7 :** Récapitulatif des essais de formulation des nanoparticules de PLGA réalisés au cours de ce travail. Synthèse des paramètres de formulation évalués et des caractéristiques physicochimiques des nanoparticules de PLGA
**Tableau 8 :** Facteurs et niveaux du plan expérimental évalués pour l'optimisation de la formulation de nanoparticules de PLGA chargées en trastuzumab**.**
**Tableau 9 :** Paramètres de formulation définis pour la préparation de nanoparticules de PLGA chargées en trastuzumab**.**
**Tableau 10 :** Réponses évaluées et objectifs d'optimisation pour la formulation de nanoparticules de PLGA chargées en trastuzumab**.**
**Tableau 11 :** composition et caractérisation physico-chimique de formulations de nanoparticules de PLGA chargées en Fab-TZB, selon un plan expérimental combinant trois concentrations de PLGA (50, 75, 100 mg/mL) et quatre compositions de stabilisant PVA/P188**.**

# LISTE DES FIGURES

**Figure 1:** Principales voies de signalisation en aval du récepteur HER2 et effets biologiques.
**Figure 2 :** Principaux mécanismes d'action du trastuzumab**.**
**Figure 3:** Cascade métastatique conduisant à des métastases cérébrales à partir d'un cancer du sein**.**
**Figure 4:** Algorithme proposé pour le traitement de première intention du cancer du sein métastatique HER2+ avec métastases cérébrales**.**
**Figure 5 :** Différentes barrières du SNC.
**Figure 6:** Structure histologique de l'unité neurovasculaire et de la barrière hémato-encéphalique (BHE)**.**
**Figure 7:** Mécanismes de transport des molécules à travers la barrière hémato-encéphalique**.**
**Figure 8:** Différences structurelles et fonctionnelles entre la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière hémato-tumorale (BHT)**.**
**Figure 9:** Résumé des principales stratégies d'administration de médicaments au système nerveux central (SNC)**.**
**Figure 10 :** Aperçu historique des approches visant le système de transport médié par le récepteur TfR pour l'administration de médicaments à travers la BHE.
**Figure 11 :** Évolution des générations de nanovecteurs.
**Figure 12:** Principales caractéristiques des nanoparticules (NP) qui influencent leur distribution systémique et leur capacité à traverser la BHE**.**
**Figure 13:** Site d'administration direct dans le SNC.
**Figure 14:** Anatomie de la cavité nasale humaine. Epithéliums de la cavité nasale.
**Figure 15:** Principales voies de transport vers le SNC après administration intranasale**.**
**Figure 16:** Facteurs influençant l'absorption et la perméabilité des médicaments à travers la muqueuse nasale**.**
**Figure 17:** Classification des systèmes nanoparticulaires pour la délivrance nasale de médicaments vers le SNC.
**Figure 18:** PLGA synthèse, dégradation et paramètres de formulations clés
**Figure 19:** Structure générale des anticorps**.**
**Figure 20:** Différents formats de fragments d'anticorps et leurs dérivés**.**
**Figure 21 :** Étapes de préparation de nanoparticules de PLGA chargées en trastuzumab (NP-TZB) par la méthode d'évaporation de solvant à double émulsion**.**
**Figure 22**: Validation de l'efficacité du protocole de lavage pour les nanoparticules de PLGA chargées en trastuzumab**.**
**Figure 23 :** Protocole de détermination de l'efficacité d'encapsulation (EE %) et de la capacité de chargement (DL %) du trastuzumab dans des nanoparticules de PLGA**.**

**Figure 24** : Évaluation de l'intégrité structurale et colloïdale du trastuzumab dans diverses conditions de stress**.**
**Figure 25:** Évaluation de la structure secondaire du trastuzumab par fluorimétrie.
**Figure 26 :** Évaluation de la fonctionnalité du trastuzumab par cytométrie en flux sur 30 jours.
**Figure 27 :** Caractérisation de nanoparticules de PLGA stabilisées au cholate de sodium.
**Figure 28 :** Influence du type de stabilisant et du rapport volumique PO/PA1 sur le rayon hydrodynamique moyen et l'indice de polydispersité (PDI).
**Figure 29 :** Influence des paramètres de formulation sur le rayon hydrodynamique moyen et l'indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules**.**
**Figure 30:** Influence de l'encapsulation du trastuzumab sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules
**Figure 31** : Influence de la quantité et de la concentration de trastuzumab introduites dans la phase aqueuse interne sur l'efficacité d'encapsulation (EE %) et le rayon hydrodynamique des nanoparticules de PLGA**.**
**Figure 32:** Caractérisation physico-chimique de la formulation sélectionnée pour la suite de l'étude**.**
**Figure 33 :** Cinétique de libération in vitro du trastuzumab (TZB) à partir de nanoparticules de PLGA incubées dans du PBS à 37 °C**.**
**Figure 34 :** Caractérisation de nanoparticules de PLGA 50/50 chargées en trastuzumab (NP-TZB) après 24 h de libération dans du PBS à 37 °C.
**Figure 35:** Évaluation de l'intégrité physique, structurelle et fonctionnelle du trastuzumab (TZB) libéré à partir de nanoparticules de PLGA dans du PBS (pH 7,4) à 37 °C.
**Figure 36 :** Impact de la formulation à des concentrations de 350 nM (C1) et 700 nM (C2) sur l'intégrité de la barrière, la fonctionnalité cellulaire et la viabilité cellulaire**.**
**Figure 37 :** Transport du NP-TZB et du F-TZB au cours du temps à travers un modèle d'épithélium nasal RPMI 2650 à différentes concentrations d'exposition.
**Figure 38 :** Analyse par cytométrie en flux de l'affinité de liaison du TZB ayant traversé la barrière muqueuse nasale (milieu RPMI 2650) aux cellules HER2-positives (BT474)**.**
**Figure 39:** structure du P188
**Figure 40 :** Influence du type de stabilisant et de l'incorporation de trastuzumab sur le rayon hydrodynamique des nanoparticules de PLGA 504H avant et après purification.
**Figure 41:** Caractérisation morphologique de nanoparticules de PLGA 504H par microscopie électronique en transmission (MET) selon le type de stabilisant PVA, PVA+P188, P188. PLGA 504H · 100 mg/mL · TZB 1 mg

**Figure 42:** Influence du type de stabilisant et de la concentration en PLGA (25, 60 et 100 mg/mL) sur le rayon hydrodynamique moyen et l'indice de polydispersité (PDI) de nanoparticules de PLGA 504H chargées en trastuzumab
**Figure 43:** Influence du type de stabilisant et de la concentration en PLGA sur l'efficacité d'encapsulation
**Figure 44 :** Modélisation prédictive de l'efficacité d'encapsulation EE %, et du taux de chargement en principe actif DL % en fonction de la concentration en PLGA et du type de stabilisant.
**Figure 45 :** Évolution du rayon hydrodynamique (Rh) de nanoparticules avant et après un essai de libération de 24 heures et 320 heures dans du PBS à 37 °C, pour des formulations à base de PVA et de PVA+P188.
**Figure 46** : Cinétique de libération du TZB à partir de nanoparticules de PLGA, en fonction du type de stabilisant et de la concentration en PLGA.
**Figure 47 :** Stabilité structurelle du TZB après sa libération à partir de nanoparticules de PLGA par comparaison des profils de dénaturation thermique (dérivée première du signal, Ti1/Ti2) du TZB libéré de nanoparticules après 24 h dans du PBS à 37 °C, par rapport au témoin non formulé.
**Figure 48 :** Analyse par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) des composants de la formulation et des nanoparticules de PLGA**.**
**Figure 49:** Spectres FTIR des différents composants de la formulation, du TZB ainsi que des nanoparticules vides et chargées en TZB.
**Figure 50:** Évaluation de la stabilité du fragment Fab-TZB dans les conditions retenues pour le procédé de formulation**.**
**Figure 51:** Caractérisation des nanoparticules de PLGA stabilisées au PVA 2 % et chargées en trastuzumab entier (TZB) ou en fragment Fab-TZB**.**
**Figure 52 :** Caractérisation de la formulation retenue de nanoparticules de PLGA chargées en Fab-TZB (PLGA 50 mg/mL ; PVA/P188 0,375 %/0,125 %)**.**
**Figure 53:** Caractérisation structurale et fonctionnelle du fragment Fab-TZB après formulation et libération à partir de nanoparticules de PLGA.
**Figure 54:** Effet du milieu de lavage sur la taille, la charge en principe actif et le potentiel zêta des nanoparticules de PVA+P188 chargées en TZB.
**Figure 55 :** Protocole expérimental utilisé pour l'étude de biodistribution in vivo.

# LISTE DES ABREVIATIONS

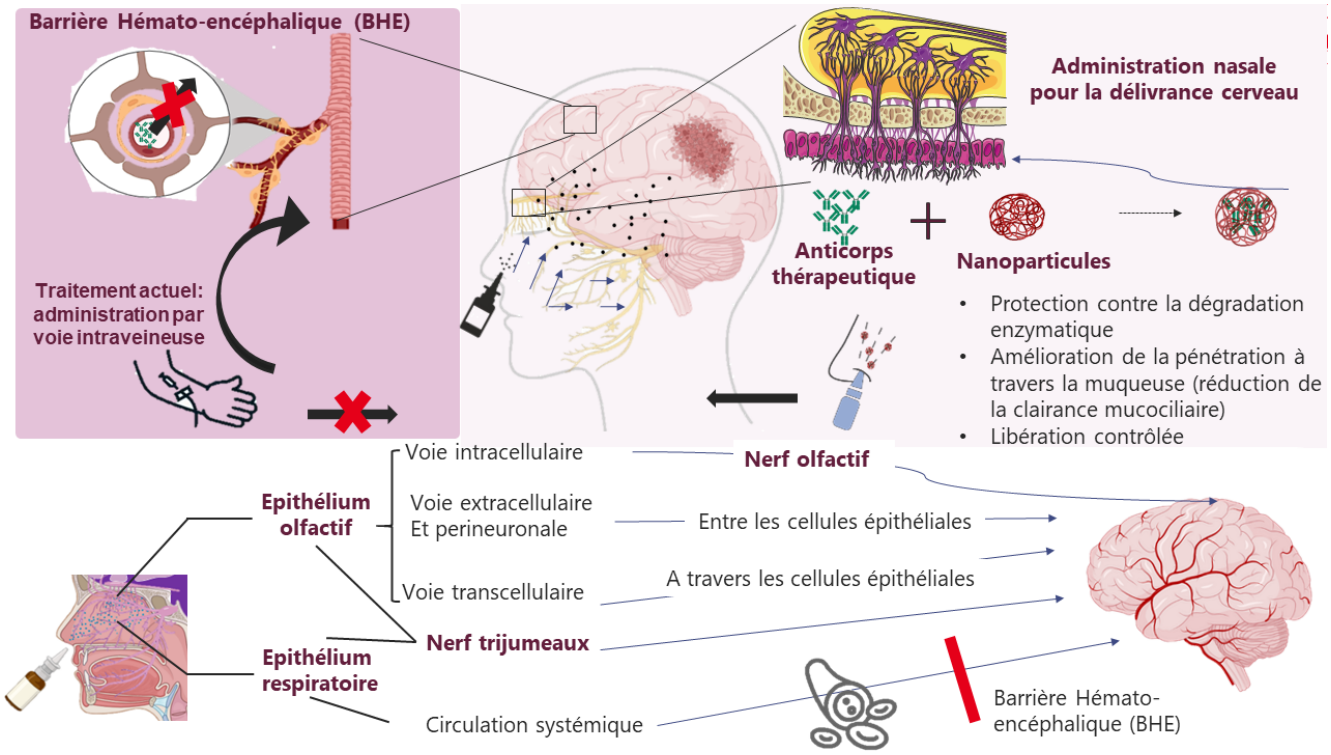
| | |
|---|---|
| SNC | Système nerveux central |
| BHE | Barrière hémato-encéphalique |
| BBB | Blood-Brain Barrier |
| BHT | Barrière hémato-tumorale |
| NP | Nanoparticule |
| TZB | Trastuzumab |
| Fab-TZB | Fragment Fab du trastuzumab |
| PLGA | Poly (lactic-co-glycolic acid) |
| FDA | Food and Drug Administration |
| EMA | Agence européenne des médicaments |
| LCR | Liquide Céphalo-Rachidien |
| BCSFB | Barrière Hémato-Méningée |
| LI | Liquide interstitiel |
| CEC | Cellules endothéliales cérébrales |
| BCRP | Breast Cancer Resistance Protein |
| RMT | Receptor-Mediated Transcytosis |
| AMT | Adsorptive-Mediated Transcytosis (Transcytose médiée par l'adsorption) |
| P-gp | P-glycoprotéine |
| SLC | Solute carrier transporters (transport médié par des transporteurs de solutés) |
| IgG | Immunoglobulines G |
| BSA | Bovine Serum Albumin (Albumine sérique bovine) |
| ADC | Antibody-Drug Conjugate (anticorps conjugué à un cytotoxique) |
| ALI | Air-Liquid Interface |
| DLS | Dynamic Light Scattering |

| | |
|---|---|
| EE | Encapsulation Efficiency |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| EPR | Enhanced Permeability and Retention |
| Fab | Fragment Antigen Binding |
| Fc | Fragment cristallisable |
| FcRn | Neonatal Fc Receptor |
| FITC | Fluorescéine isothiocyanate |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| FACS | Fluorescence-Activated Cell Sorting |
| HER2 | Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 |
| IgG | Immunoglobuline G |
| KD | Constante de dissociation |
| LCC | Liquid-Covered Culture |
| LCR | Liquide céphalorachidien |
| MFI | Mean Fluorescence Intensity |
| mAb | Monoclonal Antibody |
| N2B | Nose-to-Brain |
| NLC | Nanostructured Lipid Carrier |
| P188 | Poloxamer 188 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PDI | Polydispersity Index |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| RPMI 2650 | Lignée cellulaire d'épithélium nasal humain |
| SDS-PAGE | Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis |
| SLN | Solid Lipid Nanoparticle |
| SSP | Survie sans progression |
| TEM | Transmission Electron Microscopy |

| | |
|---|---|
| TEER | Transepithelial Electrical Resistance |
| TfR | Récepteur de la transferrine |
| Ti | Température d'inflexion |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| WBRT | Whole Brain Radiotherapy |
| ZO-1 | Zonula Occludens-1 |
| OEPC | Olfactory Epithelial Primary Cells |
| REPC | Respiratory Epithelial Primary Cells |
| Rh | Rayon hydrodynamique |
| Z-average | Diamètre hydrodynamique moyen |
| MUC | Mucin |

# INTRODUCTION GENERALE

# A. INTRODUCTION




De façon générale, le développement des médicaments ciblant le système nerveux central (SNC) est associé à des taux d'échec thérapeutique plus élevés, tant au stade préclinique qu'au stade clinique, en comparaison aux médicaments dont les cibles sont périphériques [1,2]. En 2017, on recensait un taux d'échec proche de 100 % des essais cliniques portant sur les maladies neurodégénératives. Cette tendance était particulièrement marquée dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Ces échecs dans le développement thérapeutique sont largement attribués à la présence de la BHE (barrière hémato-encéphalique), une barrière physiologique hautement sélective qui restreint l'accès des molécules thérapeutiques au parenchyme cérébral et, par conséquent réduit leur biodisponibilité cérébrale [3]. Il a été rapporté qu'environ 98% des petites molécules existantes et la quasi-totalité des macromolécules ne franchissent pas spontanément cette barrière [4]. Pour qu'une molécule franchisse la BHE, elle doit être hydrophobe et avoir une masse moléculaire inférieure à 400-500 Da. Les facteurs principaux limitant la perméabilité cérébrale sont donc le poids moléculaire élevé et l'hydrophilie.

Parallèlement, au cours de ces dernières décennies, les progrès dans le domaine de la biotechnologie, et plus particulièrement de l'immunothérapie ont permis des avancées majeures dans la prise en charge de nombreuses pathologies. L'utilisation de biothérapies, notamment les anticorps monoclonaux, a contribué à améliorer la survie des patients ainsi que leur état de santé général. Dans le cas des cancers, par exemple,

l'introduction du trastuzumab en 1998 a permis d'améliorer significativement la survie des patientes atteintes de cancer du sein HER2 positif, pour lesquelles les options thérapeutiques étaient jusque-là limitées. Cependant, il a été démontré que seule une fraction très faible d'anticorps thérapeutiques (0,01 à 0,1 %) de la quantité injectée est capable d'atteindre le cerveau après une administration systémique [5,6]. Pour faire face à cette faible biodisponibilité, de très fortes doses d'anticorps sont généralement utilisées.

Bien que des perturbations de la BHE puissent être observées dans certains contextes pathologiques, notamment aux stades avancés des tumeurs cérébrales primitives ou des métastases, il a été démontré que cette altération reste hétérogène et incomplète, limitant ainsi l'accès uniforme des médicaments au parenchyme cérébral [7]. Dans ce contexte, l'amélioration de la biodisponibilité cérébrale des anticorps thérapeutiques dans le traitement des maladies du SNC constitue un défi majeur [8]. Plusieurs stratégies sont actuellement étudiées afin d'optimiser le passage des molécules vers le parenchyme cérébral. Elles visent à surmonter la BHE à travers différentes approches. Certaines consistent à la contourner, par exemple via la voie nasale qui semble donner des résultats encourageants. D'autres reposent sur une perméabilisation transitoire, notamment grâce à l'utilisation d'ultrasons focalisés, qui ont montré une efficacité sur des modèles précliniques tout en permettant malheureusement le passage d'autres macromolécules exogènes dans le SNC. Enfin, d'autres stratégies cherchent à optimiser les propriétés physico-chimiques des molécules ou à utiliser des systèmes de vectorisation pour améliorer leur biodisponibilité cérébrale.

L'administration de médicaments pour une distribution cérébrale par la voie nasale, en contournant la BHE suscite un intérêt croissant. En effet, les terminaisons nerveuses des nerfs olfactifs et trijumeaux présentes dans la muqueuse nasale permettent l'absorption des médicaments, qui seront distribués directement dans le parenchyme cérébral [9]. Cette voie est non invasive, facile d'accès, d'effet rapide et bien acceptée par les patients. Cependant, elle présente quelques contraintes, comme un volume d'administration limité, la présence de protéases dans la muqueuse ainsi qu'une clairance mucociliaire qui nécessitent le développement de formulations adaptées pour véhiculer les médicaments dans le SNC [10]. La vectorisation à travers la nanoformulation est une approche innovante et prometteuse pour acheminer l'anticorps dans le cerveau via la voie nasale. Les nanoparticules (NPs) pourraient conférer des propriétés physico-chimiques nécessaires pour le passage nasal, protéger et véhiculer le médicament. Divers types de systèmes nanoparticulaires ont été synthétisés et testés pour l'administration de médicaments, notamment des dendrimères, des liposomes, des NPs de lipides solides [11]. Dans cette étude, nous avons mis en place une formulation de nanoparticules de PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid), un polymère biodégradable et biocompatible approuvé par la FDA et l'agence

européenne des médicaments (EMA). Le trastuzumab (TZB) a été utilisé comme modèle d'étude dans le but d'améliorer sa biodistribution cérébrale en vue d'un traitement des métastases cérébrales de cancer de sein HER2 positif.

# CHAPITRE 1 : METASTASES CEREBRALES HER2-POSITIVES

# A. GENERALITE SUR LES METASTASES CEREBRALES

## A.1 Epidémiologie et physiopathologie

Le cancer représente aujourd'hui l'un des principaux défis de santé publique. Selon les données publiées par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), environ 20 millions de nouveaux cas ont été recensés dans le monde en 2022, entraînant près de 9,7 millions de décès. Les projections indiquent une augmentation de 77 % de l'incidence mondiale d'ici 2050. Parmi tous les cancers, le cancer du sein est particulièrement préoccupant à l'échelle mondiale. En effet, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) rapporte qu'en 2022, il s'agissait du cancer le plus fréquent chez les femmes dans 157 pays sur 185 responsables de 670 000 décès dans le monde. En France, on a recensé 61 214 nouveaux cas en 2022 de cancer du sein. Il est donc le cancer le plus fréquent toutes populations confondues, dépassant les cancers de la prostate, du poumon et colorectal (Santé publique France). Chez les femmes, l'étude de 2022 montre qu'il s'agit non seulement du cancer le plus fréquent, devant le cancer colorectal (21370 cas) et le cancer du poumon (19339 cas), mais aussi de la première cause de mortalité par cancer et de la troisième cause de mortalité par cancer tous types confondus. Compte tenu de son impact majeur sur la santé, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques demeure une priorité de recherche.

Les **métastases cérébrales** sont les tumeurs intracrâniennes malignes les plus fréquentes chez l'adulte, dépassant les tumeurs primaires du SNC en termes d'incidence dans un ratio estimé de 10 à 23% [12]. Cependant, leur incidence exacte reste difficile à établir avec précision en raison du manque de recensement, des méthodes de dépistage et de l'évolution des traitements contre le cancer. Les cancers primitifs les plus fréquemment impliqués dans le développement de métastases cérébrales sont le cancer du poumon, suivi du cancer du sein et du mélanome [13].

Dans le cas du cancer du sein, ce risque dépend fortement du sous-type moléculaire de la tumeur. Les cancers du sein sont classiquement regroupés en quatre catégories selon leur profil immunohistochimique : récepteurs aux œstrogènes positifs (ER+), récepteurs à la progestérone positifs (PR+), récepteurs du facteur de croissance épidermique humain positif HER2 positifs (HER2+) et triple négatif (TNBC), défini par l'absence d'expression de ces trois récepteurs [14]. Plusieurs voies de signalisation moléculaire sont impliquées dans l'organotropisme cérébral des cellules tumorales.

Parmi ces sous-types, les cancers du sein HER2+ et triple négatifs présentent la plus forte incidence de métastases cérébrales [15].

Le **cancer du sein HER2+** représente environ 10 à 15 % de tous les cancers du sein. HER2 (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain) appartient à la famille des récepteurs tyrosine kinase ErbB, qui comprend également HER1, HER2, HER3 et HER4. Contrairement aux autres membres de cette famille, HER2 ne possède pas de ligand spécifique et agit principalement comme partenaire de dimérisation. La formation d'homodimères ou d'hétérodimères HER2/HER2 avec HER1, HER3 ou HER4 déclenche l'activation de son activité tyrosine kinase, l'autophosphorylation du récepteur et l'initiation de plusieurs cascades de signalisation intracellulaires. La surexpression de ce récepteur, généralement associée à l'amplification du gène ERBB2, conduit à l'activation constitutive de plusieurs voies de signalisation intracellulaires, notamment PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK et PLCγ. Ces voies maintiennent la prolifération et la survie des cellules tumorales, stimulent leur capacité invasive et diminuent leur sensibilité à l'apoptose, contribuant ainsi à l'agressivité et à la progression tumorales (Figure 1) [16,17]. Cette dérégulation constitue le rationnel thérapeutique du trastuzumab.

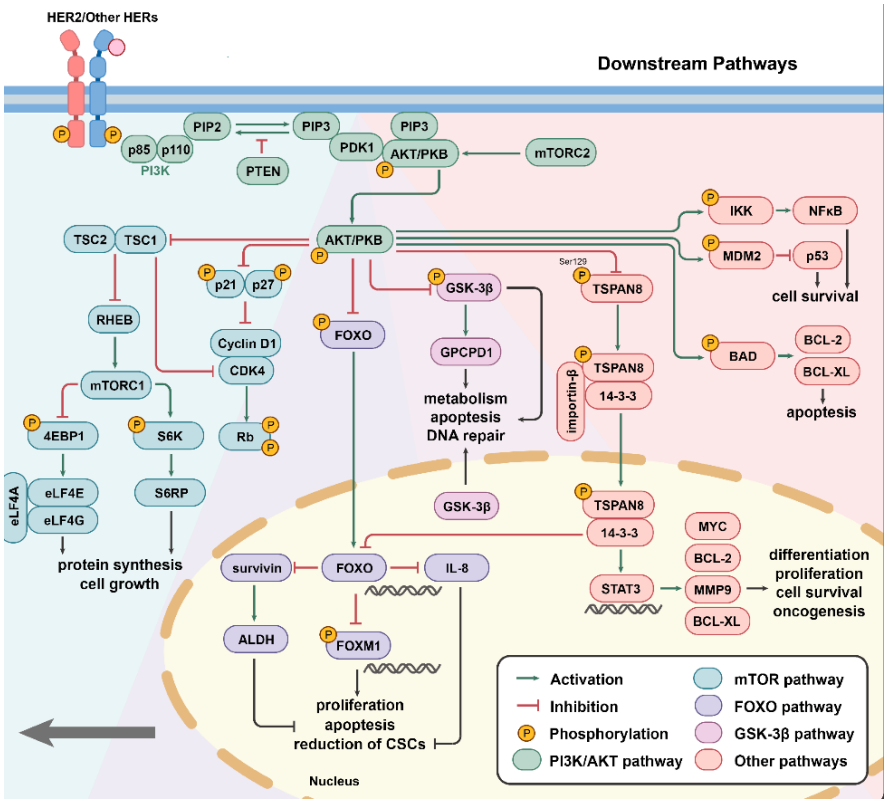



**Figure 1: Principales voies de signalisation en aval du récepteur HER2 et effets biologiques** [18]. L'activation de HER2 stimule principalement la voie PI3K/AKT/mTOR ainsi que les voies FOXO et GSK-3β, induisant la régulation de la prolifération, de la croissance cellulaire, de la survie, de l'apoptose, du

métabolisme et de l'oncogenèse. Les flèches vertes indiquent l'activation, les lignes rouges l'inhibition et les cercles jaunes les événements de phosphorylation [18].

Bien que le mécanisme d'action du trastuzumab ait longtemps été décrit simplement comme le blocage de la dimérisation de HER2, de nombreuses études menées au cours des dernières années ont montré que son activité est plus complexe et repose sur plusieurs mécanismes complémentaires [19]. Le trastuzumab se lie spécifiquement au domaine IV extracellulaire du récepteur HER2 et exerce son activité antitumorale par le biais de quatre mécanismes principaux (Figure 2) [19] . Il inhibe le clivage protéolytique de HER2 par les métalloprotéases ADAM10/17, empêchant ainsi la formation du fragment oncogénique $p95^{HER2}$. Il réduit également la signalisation dépendante de HER2, notamment en limitant la dimérisation avec HER3 ce qui diminue l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK/ERK et entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 via la régulation à la hausse de $p27^{KIP}$. De plus, le trastuzumab favorise l'internalisation du complexe HER2-trastuzumab suivie de sa dégradation lysosomale, réduisant ainsi l'expression de HER2 à la surface des cellules tumorales. Enfin, il déclenche une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) grâce à l'interaction de sa région Fc avec le récepteur FcγRIIIa (CD16) des cellules NK, ce qui conduit à la destruction des cellules tumorales.

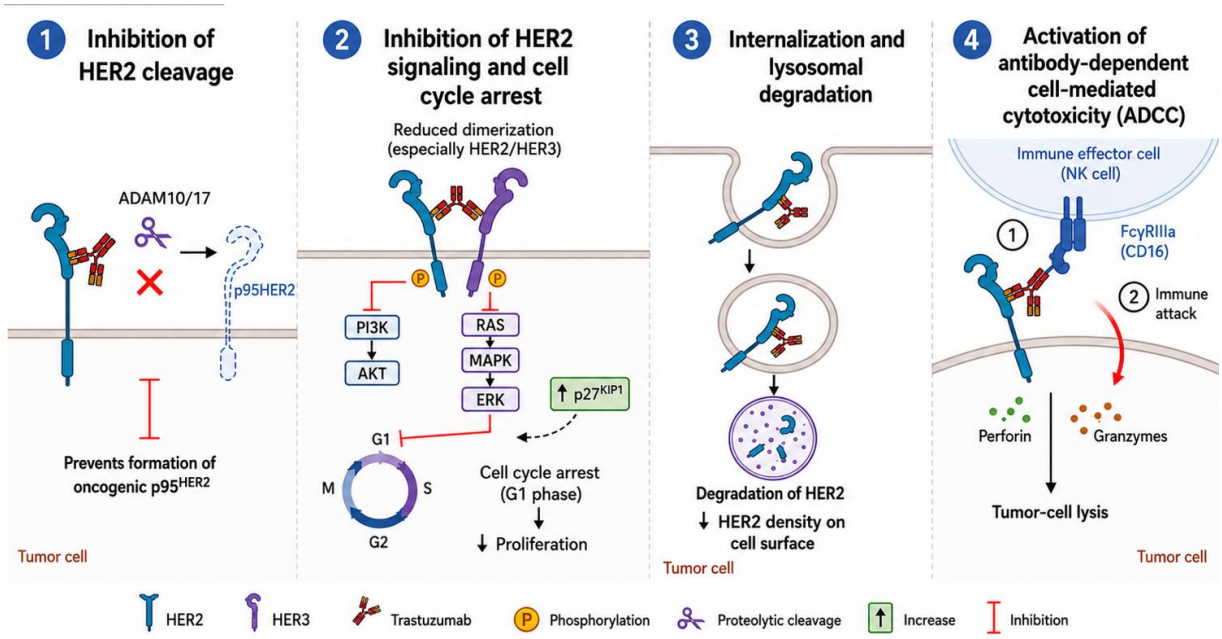



**Figure 2 : Principaux mécanismes d'action du trastuzumab.** (1) Inhibition du clivage de HER2 et de la formation du fragment oncogénique p95HER2 ; (2) Inhibition de la signalisation dépendante de HER2, entraînant un arrêt du cycle cellulaire et une réduction de la prolifération ; (3) Internalisation et dégradation lysosomale du récepteur HER2, réduisant son expression membranaire ; et (4) activation de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) via le recrutement de cellules NK, aboutissant à la lyse des cellules tumorales. *(Inspiré de Biorender* et Maadi, 2021 [19]).

## A.2 Cascade métastatique conduisant à la formation de métastases cérébrales

La formation de métastases cérébrales est un processus biologique complexe et multifactoriel résultant d'une succession d'événements cellulaires et moléculaires. Pour coloniser le SNC, les cellules tumorales doivent progressivement acquérir des caractéristiques leur permettant de quitter la tumeur primaire, de survivre dans la circulation sanguine, de franchir les barrières biologiques et de s'adapter au microenvironnement cérébral. Cette cascade métastatique comprend plusieurs étapes successives (figure 3) qui peuvent être décomposées en 6 grandes étapes [13,20–22].

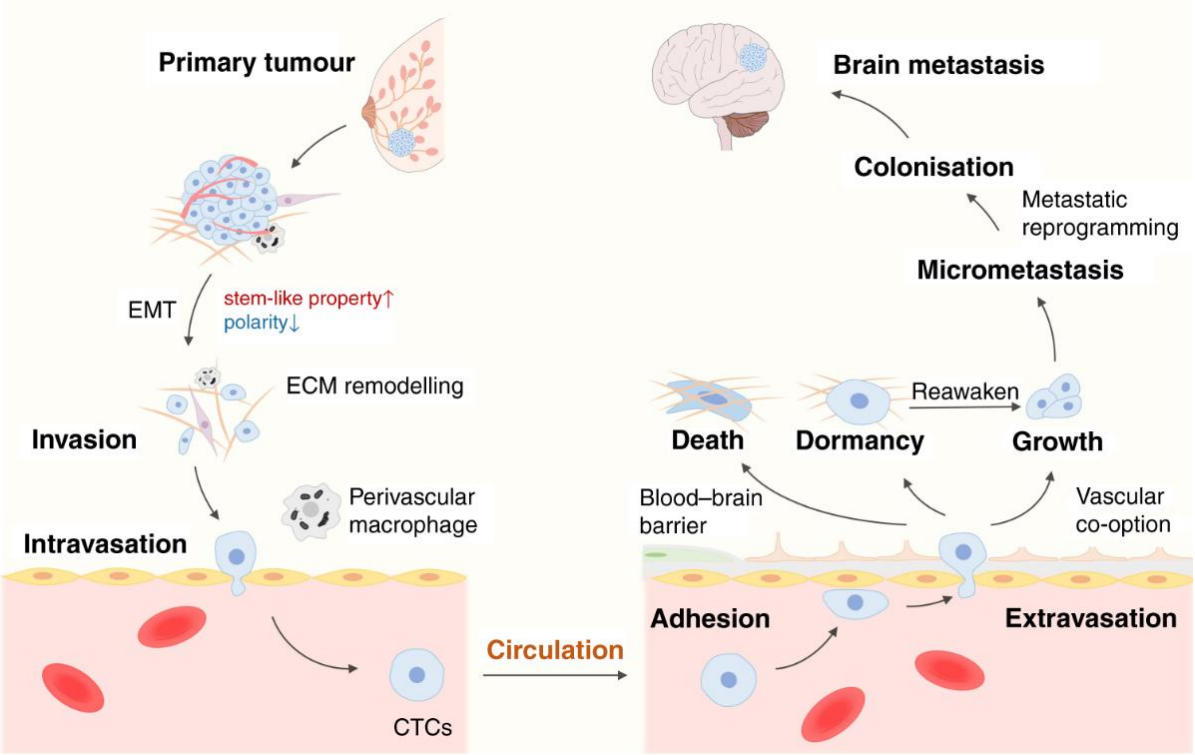



**Figure 3: Cascade métastatique conduisant à des métastases cérébrales à partir d'un cancer du sein** [22]**.** Les cellules tumorales acquièrent un phénotype invasif par transition épithélio mésenchymateuse (EMT), remodèlent la matrice extracellulaire, puis envahissent les tissus environnants avant de pénétrer dans la circulation sanguine (intravasation). Après leur dissémination sous forme de cellules tumorales circulantes (CTC), elles adhèrent à l'endothélium cérébral, traversent la barrière hémato-encéphalique (extravasation), et peuvent ensuite devenir dormantes, proliférer ou être éliminées. La colonisation du cerveau conduit finalement à la formation de micrométastases, puis de métastases cérébrales établies [22].

### 1. Transformation et développement de la tumeur primaire

La première étape consiste en la transformation maligne de cellules normales. Au cours de ce processus, l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques confère des propriétés spécifiques aux cellules tumorales, tels qu'une prolifération incontrôlée, une résistance à l'apoptose et une instabilité génomique croissante. Au sein de cette population hétérogène, certains clones acquièrent progressivement des propriétés

métastatiques, leur permettant de se disséminer vers des organes distants, notamment le cerveau.

**2. Invasion : Acquisition du phénotype invasif**

Le développement tumoral s'accompagne ensuite de modifications moléculaires qui favorisent l'invasion locale. Les cellules cancéreuses perdent progressivement leurs propriétés d'adhérence intercellulaire, remodèlent leur cytosquelette et sécrètent des enzymes capables de dégrader la matrice extracellulaire. Ces enzymes leur permettent de franchir les altérations des tissus environnants et de migrer dans la circulation sanguine.

**3. Intravasation et diffusion systémique**

Les cellules tumorales envahissent ensuite la paroi vasculaire et pénètrent dans la circulation sanguine. Une fois dans le compartiment vasculaire, elles sont exposées à de nombreuses contraintes mécaniques et immunitaires. Pour survivre, elles développent divers mécanismes d'échappement à la surveillance immunitaire et peuvent former des agrégats avec des plaquettes ou d'autres cellules circulantes.

**4. Arrêt dans la microvascularisation cérébrale et extravasation**

Après avoir été transportées par la circulation sanguine, certaines cellules tumorales s'arrêtent dans les capillaires cérébraux. Elles adhèrent alors à l'endothélium vasculaire et traversent ensuite la BHE grâce à l'activation de divers mécanismes moléculaires qui favorisent l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la migration cellulaire.

**5. Formation de micrométastases et dormance tumorale**

Une fois dans le parenchyme cérébral, les cellules tumorales doivent s'adapter à un microenvironnement particulièrement hostile. Seule une faible proportion de ces cellules survit et forme des micrométastases. Ces cellules peuvent entrer dans un état dormant pendant plusieurs mois, voire plusieurs années, sans prolifération détectable.

**6. Colonisation cérébrale et croissance tumorale**

Sous l'influence de signaux provenant du microenvironnement cérébral, certaines cellules dormantes réactivent leur prolifération. Elles induisent alors une néovascularisation locale, échappent aux mécanismes de contrôle immunitaire et forment progressivement des lésions métastatiques cliniquement détectables. Cette phase de colonisation constitue généralement l'étape limitante de la cascade métastatique et détermine l'établissement à long terme des métastases cérébrales.

# B. PRISE EN CHARGE ACTUELLE DES METASTASES CEREBRALES DU CANCER DU SEIN HER2-POSITIF

Les thérapies ciblées ont permis des avancées majeures dans la prise en charge du cancer du sein HER2 positif au cours des dernières décennies. Le trastuzumab (TZB, Herceptin®) a été le premier anticorps monoclonal anti-HER2 approuvé en 1998 [23]. Il a considérablement amélioré le pronostic des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+. En se liant au domaine extracellulaire du récepteur HER2, il inhibe sa dimérisation et les cascades de signalisation en aval (PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK), restaurant ainsi le contrôle de la prolifération et de l'apoptose des cellules tumorales [24,25]. Son efficacité sur les tumeurs primaires et les métastases extracérébrales a été largement démontrée dans la littérature, avec une amélioration significative de la survie des patients, bien que l'émergence de mécanismes de résistance ait également été rapportée [26,27]. Malgré l'efficacité du trastuzumab dans le traitement du cancer du sein HER2-positif, l'incidence des métastases cérébrales demeure élevée chez les patientes traitées [28]. En effet 40 % de patients sous traitement au trastuzumab développent des métastases cérébrales, même lorsque l'atteinte extracrânienne est contrôlée [29]. Plusieurs études ont rapporté que cette incidence est similaire à celle observée chez les patientes non exposées au trastuzumab, même si ce traitement améliore la survie des patientes présentant des métastases cérébrales [29,30].

L'efficacité des traitements au niveau cérébral reste limitée par les caractéristiques de la BHE et de la BHT, qui restreignent l'accès des médicaments au parenchyme cérébral du fait de leur faible perméabilité et de leur forte activité d'efflux. Associées au développement de résistances thérapeutiques, ces barrières contribuent à la complexité de la prise en charge des métastases cérébrales.

La prise en charge des métastases cérébrales HER2+ demeure un défi thérapeutique majeur et un besoin médical non satisfait, compte tenu de leur impact significatif sur la morbidité et la mortalité des patients. À ce jour, il n'existe pas de consensus ni de stratégie standardisée applicable à tous les patients. Leur prise en charge repose sur une approche individualisée et multidisciplinaire. Cette approche doit prendre en compte plusieurs paramètres, notamment le pronostic global du patient, la présence de symptômes neurologiques, le nombre, la taille et la résécabilité des lésions cérébrales, les traitements antérieurs et l'étendue de l'atteinte intracrânienne [31]. Selon les recommandations de la Société américaine d'oncologie clinique (ASCO) et de la Société Européenne d'Oncologie Clinique (ESMO) , le traitement des métastases cérébrales associe, le cas échéant, des thérapies locales et systémiques [28,31].

## B.1 Traitements locaux

Les traitements locaux jouent un rôle central dans la prise en charge des métastases cérébrales et reposent principalement sur trois approches thérapeutiques. La radiochirurgie stéréotaxique (SRS), qui permet l'administration ciblée d'une forte dose de rayonnement à une ou plusieurs lésions, est généralement privilégiée chez les patients présentant un nombre limité de métastases. La radiothérapie cérébrale totale (WBRT) est principalement indiquée pour les formes multiples ou diffuses, bien que son utilisation soit en diminution en raison de ses effets délétères sur les fonctions cognitives. La chirurgie est réservée aux lésions uniques ou peu nombreuses, lorsqu'elles sont résécables. Enfin, les corticostéroïdes sont fréquemment administrés en traitement adjuvant pour réduire l'œdème péritumoral et améliorer les symptômes neurologiques [31].

## B.2 Traitements systémiques

A côté des traitements locaux, une prise en charge systémique peut être envisagée, associée à des soins de support, à la participation à un essai clinique ou, lorsque cela est inévitable, à des soins palliatifs. Par exemple chez les patients présentant une progression de MC après radiothérapie cérébrale totale ou radiochirurgie stéréotaxique, y compris lorsque toute irradiation supplémentaire est impossible, un traitement systémique ayant démontré une activité au niveau du SNC peut être proposé.

Le choix du traitement systémique dépend notamment de la progression de la maladie extracrânienne et des traitements déjà reçus. Parmi les options disponibles, les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) jouent un rôle important. Grâce à leur petite taille moléculaire, ils traversent plus facilement la BHE que les anticorps monoclonaux [32]. Plusieurs essais cliniques ont démontré l'activité intracrânienne du lapatinib associé à la capécitabine (essai LANDSCAPE) et du nératinib associé à la capécitabine (essai NALA). Cependant, l'association tucatinib-trastuzumab (2018, Phase 1, NCT01921335, 41 patients) puis tucatinib-trastuzumab-capécitabine (2016, Phase 2, NCT02614794, 612 patients démontrée dans l'essai HER2CLIMB , est devenue le traitement de référence des métastases cérébrales HER2+[28,31,33–35]. Malgré des résultats encourageants, ce traitement n'a pas permis d'atteindre le seuil prédéfini de survie médiane sans progression de 12 mois. Le traitement systémique des métastases cérébrales restant complexe en raison d’une part, de la capacité limitée de la plupart des agents chimiothérapeutiques et des anticorps monoclonaux à pénétrer le SNC à travers la BHE et d’autres part de l’émergence des résistances impliquant la voie PI3K-AKT-mTOR [27,28].

Récemment les ADC Anticorps à un cytotoxique anti-HER2 représentent une avancée thérapeutique majeure. Le trastuzumab emtansine (T-DM1) a montré une activité intracrânienne modérée dans l'essai KAMILLA [36]. Des résultats plus prometteurs ont été observés avec le trastuzumab deruxtecan (T-DXd), qui a démontré des taux de réponse intracrânienne élevés dans plusieurs études, dont DESTINY-Breast [37], TUXEDO-1 et DEBBRAH [28].

Le tableau 1 et 2 récapitule les essais de phase II en cours ou récemment terminés portant sur les ADC chez les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2-positif avec métastases cérébrales actives.

**Tableau 1: Principaux essais cliniques évaluant les traitements des métastases cérébrales HER2+ du cancer du sein et leurs résultats intracrâniens**.

| | | | | Résultats cliniques obtenus | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Essai** | **Phase** | **Traitement évalué** | **Population (MC HER2+)** | **Voie d'administration** | **Principaux résultats intracrâniens** | **Population** | **Référence** |
| HER2CLIMB NCT02614794 | III | Tucatinib + Trastuzumab + Capécitabine | MC actives et stables HER2+ prétraitées | Oral (tucatinib, capécitabine) + IV (trastuzumab) | Réduit le risque de progression ou de décès de 52 % (HR 0,48 ; IC 95 % : 0,34–0,69 ; p < 0,001), avec une survie sans progression médiane de 7,6 mois contre 5,4 mois dans le bras placebo. | 612 patients (291 avec MC à l'inclusion). | [38] |
| LANDSCAPE NCT00967031 | II | Lapatinib + Capécitabine | MC non irradiées HER2+ | Oral | Taux de réponse intracrânienne 65,9 %. Survie sans progression médiane 5,5 mois. | 45 patients avec MC HER2+ non irradiées. | [39] |
| NALA NCT01808573 | III | Nératinib + Capécitabine vs Lapatinib + Capécitabine | MC stables HER2+ | Oral | Réduction des interventions SNC ; activité intracrânienne démontrée 22,8 % vs 29,2 % d'interventions | 101 patients sur 621 (16 %) MC à l'inclusion | [40] |
| KAMILLA NCT01702571 | IIIb | Trastuzumab emtansine T-DM1 | MC stables ou traitées HER2+ | IV | Taux de réponse globale 21,4 %, taux de bénéfice clinique 42,9 %. SSP médiane 5,5 mois, SG médiane 18,9 mois. | 398 patients avec MC à l'inclusion (126 avec MC mesurables). | [41] |
| TUXEDO-1 NCT04752059 | II | Trastuzumab déruxtécan (T-DXd) | MC actives HER2+ | IV | Taux de réponse intracrânienne 73,3 %. SSP médiane 14 mois. Réponses complètes intracrâniennes observées. Résultats parmi les plus élevés rapportés dans les MC actives HER2+. | 15 patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+ avec MC actives | [42] |
| DEBBRAH NCT04420598. | II | T-DXd | MC stables et actives HER2+ | IV | Stabilisation prolongée ≥ 24 semaines : 71,4 % (5/7 patients) Suivi médian : 12,0 mois (range 2,5–18,6). | Cohortes MC stables et actives 7 patients seulement, tous avec une maladie leptoméningée (LMD) confirmée pathologiquement | [43] |
| DESTINY-Breast12 | IIIb | T-DXd | MC actives et stables HER2+ | IV | Taux de réponse intracrânienne globale 45,2–45,5 % (MC non traitées et traitées). SSP-SNC 12,3–18,5 mois. | 148 patients avec MC | [44] |

**Tableau 2 : Principaux essais cliniques en cours évaluant de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les métastases cérébrales du cancer du sein HER2+.**

| Essais en cours | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Essai** | **Phase** | **Traitement** | **Population cible** | **Objectif principal** | **Statut** | **Référence / NCT** |
| DESTINY-Breast12 | IIIb | T-DXd | MC HER2+ actives et stables | Confirmer l'efficacité intracrânienne du T-DXd | En cours | NCT04739761 |
| DESTINY-Breast07 | Ib/II | T-DXd ± Pertuzumab | MC HER2+ | Optimisation des associations thérapeutiques | En cours | NCT04538742 |
| HER2CLIMB-04 | II | Tucatinib + T-DXd | MC HER2+ prétraitées | Évaluer la synergie TKI + ADC | Recrutement terminé | NCT04539938 |
| TUXEDO-3 | II | Patritumab déruxtécan (HER3-DXd) | MC HER2-MC leptoméningée des tumeurs solides | Évaluer les ADC anti-HER3 dans les MC | En cours | NCT05865990 |
| TUXEDO-4 | II | T-DXd | HER2-low avec MC | Extension du bénéfice du T-DXd aux HER2-low | En cours | NCT06048718 |

Ces résultats suggèrent que le T-DXd pourrait devenir un nouveau traitement de référence pour les métastases cérébrales HER2+[28]. Cependant, le nombre limité de patientes inclues dans ces essais n'a pas permis de modifier officiellement les recommandations. Les essais cliniques actuellement en cours, devraient fournir des données supplémentaires sur l'efficacité du T-DXd dans les métastases cérébrales actives et stables.

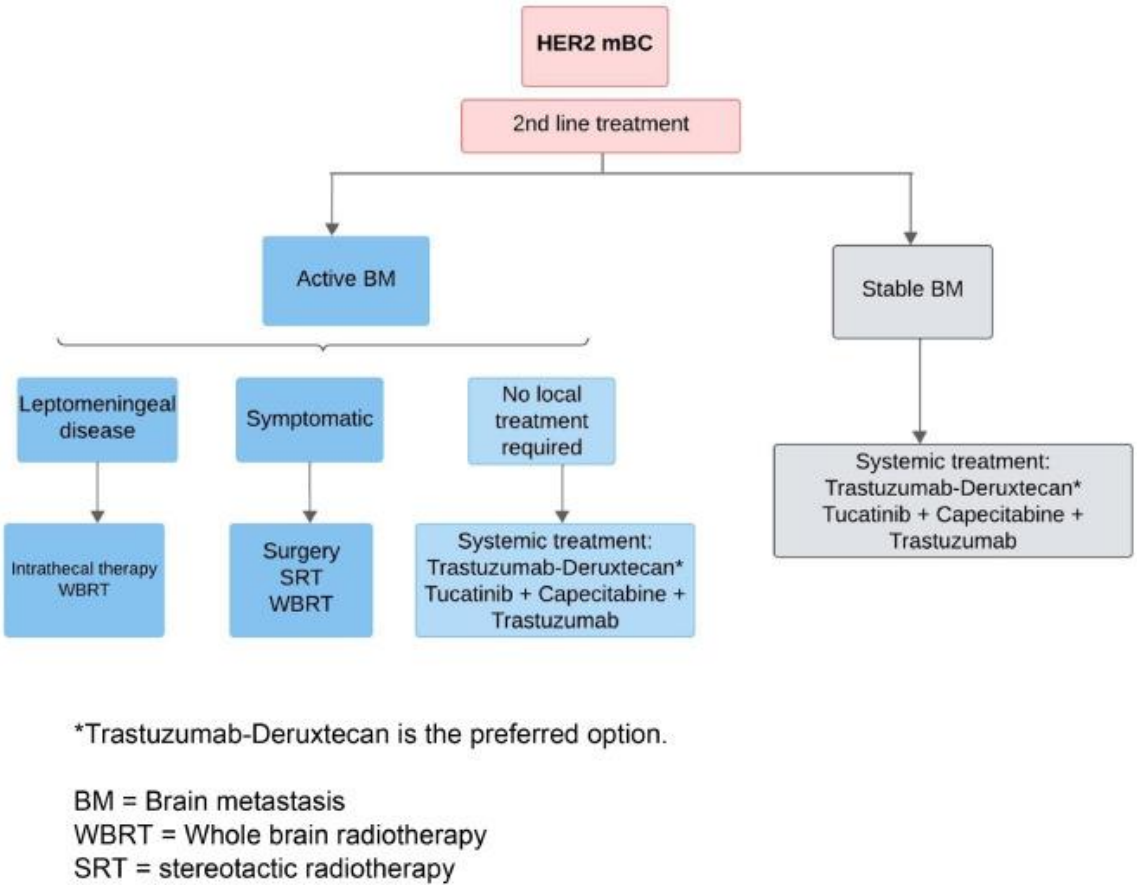



**Figure 4: Algorithme proposé pour le traitement de première intention du cancer du sein métastatique HER2+ avec métastases cérébrales.** Récapitulatif des stratégies thérapeutiques de deuxième ligne selon le statut des métastases cérébrales (actives ou stables), incluant les traitements locaux et systémiques [45].

En résumé, la prise en charge des métastases cérébrales HER2+ repose actuellement sur une association de traitements locaux et systémiques adaptés à chaque situation clinique. La radiochirurgie stéréotaxique est privilégiée pour les petites lésions, tandis que la radiothérapie cérébrale totale est réservée aux formes plus étendues. Parmi les traitements systémiques, l'association tucatinib, trastuzumab et capécitabine constitue actuellement le traitement de référence, tandis que le trastuzumab deruxtecan (T-DXd) est de plus en plus exploré, grâce à son importante activité intracrânienne (figure 4). Malgré ces progrès, les métastases cérébrales HER2+ restent difficiles à traiter, soulignant la nécessité de développer de nouvelles stratégies permettant d'améliorer l'administration des médicaments au cerveau.

# CHAPITRE 2 : LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : UN DEFI DANS L'ADMINISTRATION CEREBRALE DE MOLECULES ACTIVES

## A. LES DIFFERENTES BARRIERES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Le cerveau est un organe particulier isolé des autres organes par une vascularisation spécifique qui le protège. Cette vascularisation est constituée d'un réseau de microvaisseaux présentant des propriétés particulières limitant les échanges entre le sang et le tissu cérébral [46]. L'existence d'une barrière entre le sang et le parenchyme cérébral découle d'une observation faite par Paul Ehrlich en 1885. Après une injection intraveineuse du colorant bleu d'Evan chez des rats, il a constaté que tous les organes étaient colorés à l'exception du cerveau et du LCR (liquide céphalo-rachidien). En 1913, Edwin Goldmann a mené une expérience complémentaire consistant à injecter le colorant directement dans le LCR, montrant que seul le tissu cérébral était coloré [47]. Ces observations suggèrent l'existence d'une barrière empêchant les échanges entre le SNC et le sang.

Ces données préliminaires ainsi que les travaux de recherches ultérieurs, ont permis d'établir que trois barrières distinctes séparent sur le plan physique et fonctionnel, le liquide extracellulaire du SNC du sang : la barrière arachnoïdienne, la barrière hémato-méningée (BCSFB) et la barrière hématoencéphalique (BHE) (figure 5). Ces barrières forment des interfaces qui maintiennent l'homéostasie du système nerveux central en régulant les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral. La fonction de barrière résulte de la combinaison de plusieurs mécanismes, notamment la barrière physique, assurée par les jonctions serrées entre les cellules qui limitent le flux à travers l'espace intercellulaire (transport paracellulaire) ; la barrière de transport, qui permet l'apport de solutés au système nerveux central ; et la barrière métabolique, qui repose sur la présence d'enzymes capables de métaboliser les molécules en transit. Ces interfaces correspondent à la séparation entre le sang et le parenchyme cérébral via la barrière BHE, ainsi qu'entre le sang et le LCR à travers la BHE [48].

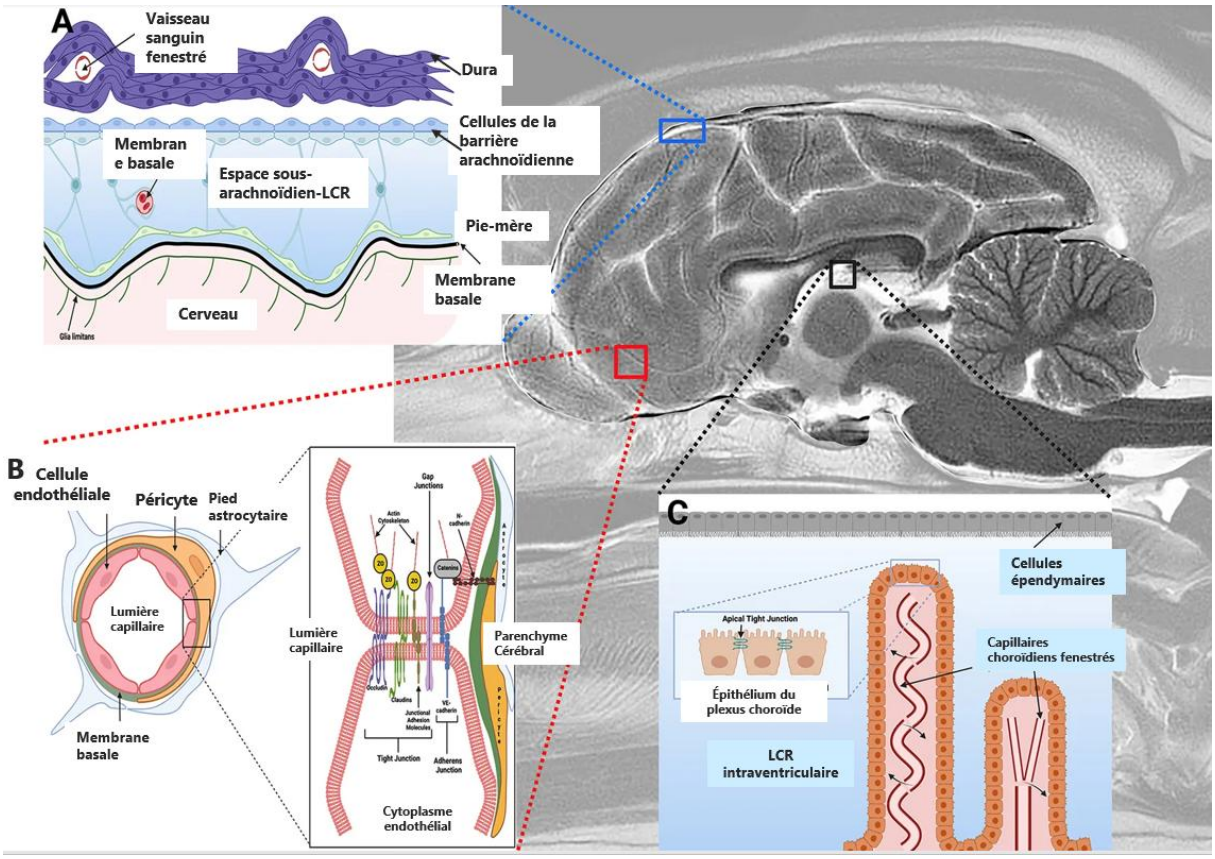



**Figure 5 : Différentes barrières du SNC**. a) Barrière arachnoidienne; b) Barrière hémato-encéphalique ; c) Barrière Sang–LCR (BHL) [49];

## A.1 La barrière Sang-LCR ou barrière hémato-liquidienne

### A.1.1 Le liquide cérébrospinal : composition et production

Le cerveau et la moelle épinière baignent dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), un compartiment liquidien essentiel au maintien de l'homéostasie du SNC. Le LCR joue un rôle mécanique majeur en agissant comme un coussin protecteur contre les chocs, en assurant un soutien liquidien qui permet la flottaison du cerveau et préserve son intégrité structurelle [50]. Outre cette fonction protectrice, le LCR contribue également à la stabilité physiologique du SNC, au transport de molécules et à la surveillance immunitaire du compartiment cérébral [50].

Le LCR a une composition similaire à celle du liquide interstitiel cérébral : il est principalement composé d'eau (environ 99 %) et contient 1 % de protéines, du glucose, des ions, des vitamines et des neurotransmetteurs [51,52]. Il est principalement produit par les plexus choroïdes, structures très vascularisées situées dans les ventricules latéraux, le troisième et le quatrième ventricule du cerveau. La production de LCR est estimée à environ 640 mL par jour, avec un renouvellement complet du volume liquidien plusieurs fois par jour (environ 3 à 5 fois) [53].

### A.1.2 Circulation du LCR

Après sa production dans les plexus choroïdes, le LCR circule dans les ventricules cérébraux, puis pénètre dans la grande citerne avant d'atteindre la surface externe du cerveau et de la moelle épinière par les espaces sous-arachnoïdiens [54]. Il est ensuite réabsorbé dans la circulation sanguine veineuse au niveau des granulations arachnoïdiennes, situées principalement au-dessus des hémisphères cérébraux [54].

### A.1.3 Structure anatomique de la barrière sang-LCR

La barrière sang-LCR, également appelée barrière hémato-liquidienne (BHL), constitue l'interface physiologique qui régule les échanges entre le compartiment sanguin et le LCR. Histologiquement, cette barrière est principalement formée d'une couche de cellules épithéliales cuboïdes du plexus choroïde, reliées entre elles par des jonctions serrées et en contact direct avec le LCR (Figure 5C). Ces cellules épithéliales reposent sur une membrane basale qui les sépare d'un réseau de capillaires fenêtrés [48]. Contrairement à la BHE, où les jonctions serrées sont situées entre les cellules endothéliales cérébrales, la BHL dépend donc de l'intégrité de l'épithélium choroïdien.

La surface d'échange des plexus choroïdes humains est estimée à environ 0,021 $m^2$, ce qui est nettement inférieur à celle des capillaires cérébraux, qui forment un réseau vasculaire d'environ 640 $km^2$ [55]. Malgré cette surface limitée, la BHL joue un rôle crucial dans le contrôle du passage des molécules entre le sang et le LCR. Ces échanges peuvent se produire par différentes voies, notamment par les pores de l'épithélium ou par des mécanismes de transport intracellulaire. De manière générale, les petites molécules et certaines macromolécules présentes dans le sang peuvent atteindre le LCR, la diffusion étant inversement proportionnelle à leur taille [55].

Cependant, la présence d'une molécule thérapeutique dans le LCR ne reflète pas nécessairement sa capacité à atteindre le parenchyme cérébral. En effet, un médicament administré directement dans le LCR peut être rapidement éliminé dans la circulation sanguine, tout en présentant une diffusion limitée dans le liquide interstitiel cérébral en raison de la présence de la BHE. Ainsi, l'accès au LCR n'est pas un indicateur fiable d'une biodisponibilité intracérébrale effective [55].

Cette problématique est particulièrement importante dans le développement de stratégies thérapeutiques ciblant le SNC. Les voies d'administration dites « directes », telles que l'injection intracérébroventriculaire ou intrathécale, qui visent à administrer un médicament directement dans le compartiment du LCR, ne garantissent pas nécessairement une pénétration efficace dans le tissu cérébral. Ces approches ont même été comparées à une « perfusion intraveineuse lente », car les molécules administrées dans le LCR peuvent se retrouver rapidement dans la circulation systémique et diffuser faiblement vers le parenchyme cérébral [55]. Pour atteindre les cellules cérébrales, le médicament doit en effet traverser l'endothélium microvasculaire cérébral qui constitue la barrière hémato-encéphalique.

De plus, cette limitation est particulièrement critique pour les anticorps monoclonaux tels que le trastuzumab (TZB), dont le passage dans le SNC est fortement restreint.

Après administration intraveineuse de TZB, plusieurs études ont rapporté des concentrations dans le LCR jusqu'à 300 fois inférieures à celles observées dans le plasma [56]. Chez les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2-positif avec métastases cérébrales, les concentrations de TZB dans le LCR sont même restées indétectables après administration intraveineuse [26]. Ces observations suggèrent une faible perméabilité des barrières cérébrales aux anticorps monoclonaux, malgré les altérations potentielles de ces barrières associées aux processus tumoraux.

À l'inverse, l'administration directe de TZB dans le LCR augmente son exposition aux compartiments cérébraux. Cependant, une étude utilisant l'administration intraventriculaire de TZB a montré une clairance rapide de l'anticorps du LCR, associée à une augmentation concomitante de sa concentration sérique [26] . Cette élimination pourrait être liée à l'expression du FcRn (récepteur Fc néonatal) sur les cellules épithéliales des plexus choroïdes, favorisant la transcytose inverse des immunoglobulines IgG dans le sang [57]. Ainsi, pour compenser cette élimination rapide du TZB du LCR, une augmentation des doses administrées s'avère nécessaire, malgré un risque de toxicité systémique.

De plus, la diffusion des molécules thérapeutiques du LCR vers le parenchyme cérébral diminue de façon exponentielle avec la distance à la surface du LCR [58,59]. En effet, une fois administrées dans le LCR, les molécules thérapeutiques doivent encore diffuser passivement depuis la surface du LCR (l'interface pie-mère/parenchyme ou la paroi épendymaire) pour atteindre les tissus cérébraux profonds. Ce processus de diffusion obéit à une loi physique bien établie : la concentration diminue en fonction du carré de la distance parcourue dans le tissu, ce qui se traduit concrètement par une diminution très rapide et non linéaire de la concentration à mesure que l'on s'éloigne de la surface du LCR [58,59]. Ce phénomène est accentué par le fait que la molécule est progressivement captée et éliminée par les capillaires cérébraux à mesure qu'elle diffuse dans le parenchyme [59]. Cette diffusion lente, associée à une élimination continue, limite sa pénétration dans les tissus profonds. Ainsi, seules les régions superficielles du cerveau sont exposées de manière significative au médicament, tandis que les régions plus profondes restent faiblement exposées, malgré des concentrations élevées dans le LCS [59]. L'administration intrathécale permet donc d'atteindre des concentrations médicamenteuses élevées au niveau des surfaces méningées et épendymaires, mais peut également exposer ces zones à des concentrations importantes susceptibles d'entraîner des effets indésirables locaux. Néanmoins, cette approche peut s'avérer avantageuse dans certaines pathologies, notamment lorsque l'objectif thérapeutique est de cibler les méninges, comme dans le traitement de l'infiltration méningée par des cellules leucémiques, où l'administration intrathécale permet d'acheminer le médicament directement dans LCR.

## A.2 La barrière arachnoïdienne

La barrière arachnoïdienne est considérée comme une composante méningée de la BHL. Elle est composée d'une couche de cellules épithéliales avasculaires liées entre elles par des jonctions serrées qui sépare le LCR de l'espace sous-arachnoidien de la dure-mère sus-jacente (figure 5A). Elle forme une barrière de protection entre les vaisseaux sanguins fenestrés de la dure-mère et le LCR. Sa contribution aux échanges reste minimale en raison de son avascularité et de sa surface relativement petite [48].

## A.3 La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est la plus grande interface pour les échanges sang-cerveau compris entre 12 et 18 $m^2$ pour un adulte moyen [48,60]. Cette barrière est très sélective et joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie du microenvironnement cérébral à travers la régulation des échanges entre le sang et le parenchyme cérébral. Elle remplit une double fonction : elle protège le cerveau des composés neurotoxiques en maintenant une forte résistance transendothéliale, tout en assurant le transport sélectif des nutriments et des facteurs neurotrophiques vers le SNC. La BHE est une barrière à la fois physique (empêchant la fuite de fluide) et métabolique (sécrétion et libération de certains enzymes). La sélectivité de la BHE repose sur des caractéristiques structurales et fonctionnelles propres aux capillaires cérébraux qui se distinguent de ceux des organes périphériques.

# B. PHYSIOLOGIE ET ANATOMIE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

## B.1. Structure /Organisation

La BHE est une interface dynamique multicellulaire composée de cellules épithéliales, de péricytes et de pieds d'astrocyte. A côté des cellules, on retrouve deux revêtements, notamment le glycocalyx et la membrane basale (figures 5B et 6) [61]. Cet ensemble avec les neurones et les autres cellules gliales forme l'unité neurovasculaire.

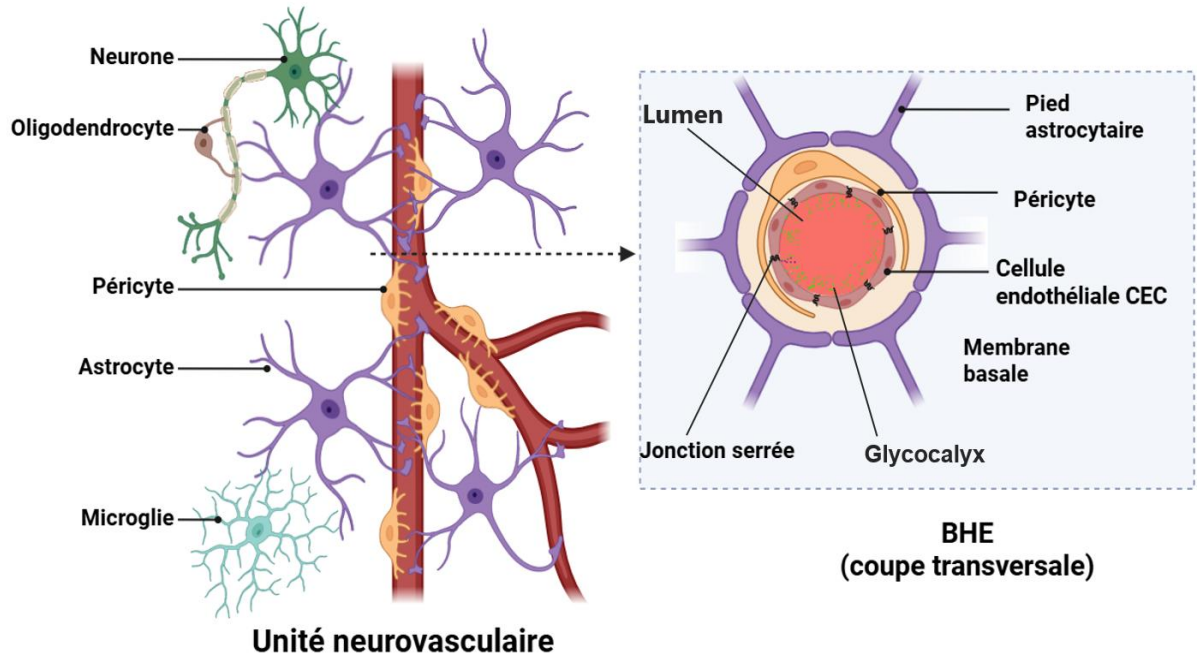



**Figure 6: Structure histologique de l'unité neurovasculaire et de la barrière hémato-encéphalique (BHE).** Schéma d'un capillaire cérébral en coupe transversale montrant les différents composant la BHE. (Créée avec Biorender)

### B.1.1 Les cellules endothéliale

Les cellules endothéliales cérébrales (CEC) constituent le principal composant structurel de la BHE. Elles tapissent les capillaires cérébraux et forment l'interface entre la circulation sanguine et le parenchyme cérébral. Contrairement aux cellules endothéliales périphériques, les CEC possèdent des caractéristiques morphologiques, structurelles et fonctionnelles spécifiques qui leur confèrent une perméabilité extrêmement faible et un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du SNC [62,63].

**Sur le plan morphologique**, la principale caractéristique des CEC réside dans la présence de jonctions intercellulaires hautement imperméables appelées jonctions

serrées (« *tight junctions* »). Ces structures sont principalement constituées de protéines transmembranaires telles que les claudines et les occludines, ainsi que de protéines de liaison cytoplasmiques telles que ZO-1 et ZO-2. Elles assurent un contact étroit entre les cellules endothéliales et séparent le compartiment luminal, en contact avec le sang, du compartiment basolatéral tourné vers le parenchyme cérébral. Ces jonctions constituent un mécanisme majeur de contrôle de la perméabilité paracellulaire en limitant fortement le passage des molécules hydrosolubles entre les cellules [64].

Outre cette restriction du transport paracellulaire, les CEC se distinguent des cellules endothéliales périphériques par l'absence de fenestrations ou de pores transcellulaires. Cette particularité limite considérablement le passage incontrôlé de molécules entre le sang et le parenchyme cérébral [65].

Les CEC présentent également une densité mitochondriale plus élevée que les cellules endothéliales périphériques, les mitochondries représentant environ 10 à 11 % du volume cytoplasmique, contre 2 à 5 % dans les cellules endothéliales périphériques. Cette densité mitochondriale élevée reflète les besoins énergétiques importants nécessaires au maintien de l'intégrité de la barrière et l'activité métabolique significative associée aux mécanismes de transport membranaire [66].

**Sur le plan fonctionnel**, les BHE jouent un rôle actif dans la régulation des échanges de substances entre le sang et le cerveau. La surface de leur membrane présente une charge nette négative, ce qui limite le passage de certaines molécules chargées négativement. De plus, elles présentent une faible expression des molécules d'adhésion leucocytaire, ce qui réduit la migration des cellules immunitaires circulantes vers le parenchyme cérébral dans des conditions physiologiques [64].

Les CEC présentent une polarisation membranaire, avec une organisation différente des protéines de transport entre la membrane luminale, exposée au sang, et la membrane basolatérale, en contact avec le tissu cérébral [67]. Cette polarisation permet un contrôle sélectif du transport des nutriments et des molécules nécessaires à la fonction neuronale. Elle repose notamment sur l'expression de transporteurs spécifiques impliqués dans le passage de substances entre le sang et le cerveau. Parmi ces mécanismes, les systèmes d'efflux jouent un rôle majeur dans la fonction de barrière. La glycoprotéine P (P-gp), la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP) et certains transporteurs d'anions organiques (OATP) permettent l'expulsion active de nombreuses molécules, dont des médicaments, des cellules endothéliales vers la circulation sanguine, limitant ainsi leur accumulation dans le SNC [68]

Une autre caractéristique importante des CEC est leur **très faible activité pinocytique**. Contrairement aux autres cellules endothéliales, elles présentent une faible densité de vésicules d'endocytose ce qui réduit considérablement le transport transcellulaire non spécifique par cette voie [69]. Cette propriété constitue une limitation majeure pour le passage des macromolécules, notamment des immunoglobulines (IgG). La transcytose des IgG implique une internalisation initiale par pinocytose en phase liquide, suivie

d'une interaction intracellulaire avec les récepteurs FcRn, permettant leur recyclage ou leur transport.

De plus, les CEC contribuent également à la **fonction métabolique** de la BHE par l'expression d'enzymes capables de métaboliser certaines molécules circulantes, notamment les enzymes de la famille du cytochrome P450 [70]. Cette activité enzymatique participe à la dégradation ou à la modification des composés exogènes avant qu'ils n'atteignent le compartiment cérébral.

Ainsi, l'ensemble de ces propriétés morphologiques et fonctionnelles confère aux CEC un rôle central dans la sélectivité de la BHE. Elles assurent une régulation fine des échanges entre le sang et le cerveau afin de maintenir un microenvironnement cérébral stable, essentiel à la fonction neuronale. Toutefois, l'intégrité et l'activité de la BHE ne dépendent pas uniquement des CEC. Elles sont également tributaires de l'interaction avec d'autres composants de l'unité neurovasculaire, notamment les péricytes et les astrocytes, qui constituent une interface entre les vaisseaux sanguins, CEC et les neurones.

### B.1.2 Les péricytes

Les péricytes sont des cellules murales distribuées à intervalle régulier le long de la paroi des capillaires sanguins sur leur face abluminale. Ils étendent leurs prolongements cytoplasmiques à partir du corps cellulaire, leur permettant de recouvrir plusieurs CEC adjacentes. Elles sont incrustées dans la membrane basale. Contrairement aux tissus périphériques, le cerveau et la rétine ont un ratio péricytes/cellules endothéliales le plus élevé estimé à 1 pour 5 [71,72]. Les péricytes jouent un rôle très important dans le maintien de la fonctionnalité cérébrale. Elles occupent une place unique au sein de l'unité neurovasculaire, ou elles agissent comme intégrateurs, coordinateurs et effecteurs de nombreuses fonctions neurovasculaires, notamment l'angiogenèse, la formation et le maintien de la BHE, la stabilité vasculaire, l'angio-architecture, la régulation du flux sanguin capillaire ainsi que l'élimination des toxiques nécessaires au bon fonctionnement du SNC et des neurones [73,74]. Elles sont importantes pour la formation de la BHE, car leur degré de recouvrement des capillaires cérébraux est déterminant pour la perméabilité vasculaire relative. Des études récentes ont révélé qu'une déficience en péricytes dans le SNC entraine une altération de la BHE et une hypoperfusion cérébrale conduisant à des modifications neurodégénératives secondaires [70,72].

### B.1.3 Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes du SNC. Ils enveloppent les capillaires cérébraux et forment la couche la plus externe de la paroi vasculaire. Leurs pieds polarisés se fixent à la membrane basale grâce à l'interaction d'un ensemble de protéines (aquaporine IV et complexe dystroglycane-dystrophine) avec le protéoglycane agrine [46]. De manière générale, les astrocytes jouent un rôle essentiel dans le SNC en participant à la signalisation dynamique, à l'élimination des déchets, à l'ajustement du flux sanguin cérébral, à la régulation de la fonction vasculaire, au

maintien de l'homéostasie ionique et à l'équilibre des réponses neuro-immunes. La proximité étroite des pieds astrocytaires avec les cellules endothéliales suggère l'existence d'une communication ou des interactions fonctionnelles spécifiques entre ces deux types cellulaires constituant la BHE. Le rôle exact des astrocytes dans le fonctionnement de la BHE reste toutefois controversé [75].

Bien qu'il ne semble pas indispensable à la formation initiale de la BHE au cours du développement, leur apparition après la mise en place de la barrière suggère qu'ils interviennent dans son maintien et sa modulation. En effet, les études *in vivo* chez l'embryon de rongeur indiquent que la BHE se met en place avant l'apparition des astrocytes suggérant que ces cellules ne participent pas à l'induction de la formation de la BHE [76]. Cependant, l'identification de facteurs sécrétés par les astrocytes indique que les astrocytes matures jouent un rôle essentiel dans la modulation et le maintien des propriétés de la barrière [77]. Dans les études visant à la mise en place des modèles *in vitro* de BHE, il a été démontré que les astrocytes influencent la différenciation des cellules endothéliales, la polarisation cellulaire et l'expression des protéines de jonctions serrées, contribuant ainsi à la régulation de la perméabilité et au phénotype immuno-quiescent de la BHE [78]. En conclusion, ces études confortent que la régulation de la fonction de barrière de la BHE est un processus multifactoriel.

### B.1.4 Membrane basale

La membrane basale est le revêtement situé du côté basolatéral des CEC. Les CEC, les péricytes et les astrocytes synthétisent et déposent des protéines dans l'espace extracellulaire, formant une matrice extracellulaire qui est la membrane basale. Au niveau du SNC le canal vasculaire est entouré de deux couches : une membrane basale vasculaire interne dérivée des CEC et une membrane basale parenchymateuse externe dérivée des astrocytes [79]. La membrane basale est composée de différentes molécules notamment le collagène de type IV, la laminine, le nidogène, des protéoglycanes à héparane sulfate, la fibronectine et diverses autres glycoprotéines [80]. Cette matrice de protéines et glycoprotéine forme un réseau complexe tridimensionnel formant un support mécanique cellulaire au sein de la BHE [81].

Sa composition en acides aminés, en acide sialique et en protéoglycanes sulfatés rend la membrane basale porteuse de charges anioniques [82]. Ces caractéristiques physico-chimiques contribuent à son rôle de barrière sélective en plus des propriétés de barrière de l'endothélium cérébral. La dégradation de la membrane basale par les métalloprotéases ou des collagénases dans les contextes pathologiques est impliquée dans la perturbation de l'intégrité de la BHE [83].

### B.1.5 Le glycocalyx

Le glycocalyx est la couche la plus superficielle qui tapisse la lumière des capillaires des vaisseaux du SNC. Elle est caractérisée par une structure dense, irrégulière et filamentaire formant un revêtement continu à la surface des cellules endothéliales [84]. Au microscope électronique l'épaisseur du glycocalyx de l'endothélium vasculaire est de 0,1 à 11 µm [84]. Il s'agit d'un polymère de protéoglycanes et de chaîne de

glycosaminoglycanes constitué principalement de syndécanes et de glypicanes. Le glycocalyx est, synthétisé et sécrété par des cellules CEC, et reste étroitement lié à la membrane plasmique de ces cellules [85,86]. Parmi ces constituants, on retrouve l'héparane sulfate, la chondroïtine sulfate et hyaluronane, qui constituent les composantes les plus abondantes du glycocalyx et en grande partie responsables de sa charge anionique [87]. Cette charge négative est à l'origine des interactions électrostatiques avec les protéines plasmatiques et les ions chargés positivement, cependant entrainant la répulsion d'autres molécules chargées négativement telles que l'albumine. Des études ont montré que cette charge négative est importante pour les propriétés de barrière de la BHE, car la neutralisation des charges négatives du glycocalyx par la myélopéroxydase peut induire une augmentation de la perméabilité vasculaire [88]. D'autre part, une altération du glycocalyx augmente le transport de l'eau, des protéines et d'autres molécules du plasma vers l'extérieur des vaisseaux sanguins [89]. Aussi, cette altération peut être à l'origine de l'exposition des molécules d'adhésion cellulaires et vasculaires tels que les ICAM-1 et VCAM-1 présentes dans le glycocalyx et donc être à responsable de l'adhésion des leucocytes à la BHE et de leur migration à travers celle-ci [90]. Ces adhésions sont à leur tour à l'origine d'une série d'inflammations et de changements pathologiques. A travers ces différents rôles notamment de l'isolation physique, la répulsion électrostatique des molécules chargées négativement et son rôle anti-adhésion cellulaire et vasculaire, le glycocalyx endothélial est un élément essentiel dans la fonction de barrière de la BHE agissant comme la première ligne de défense dans la protection du cerveau [91].

## B.2 Mécanisme de transports

### B.2.1 Mécanismes généraux

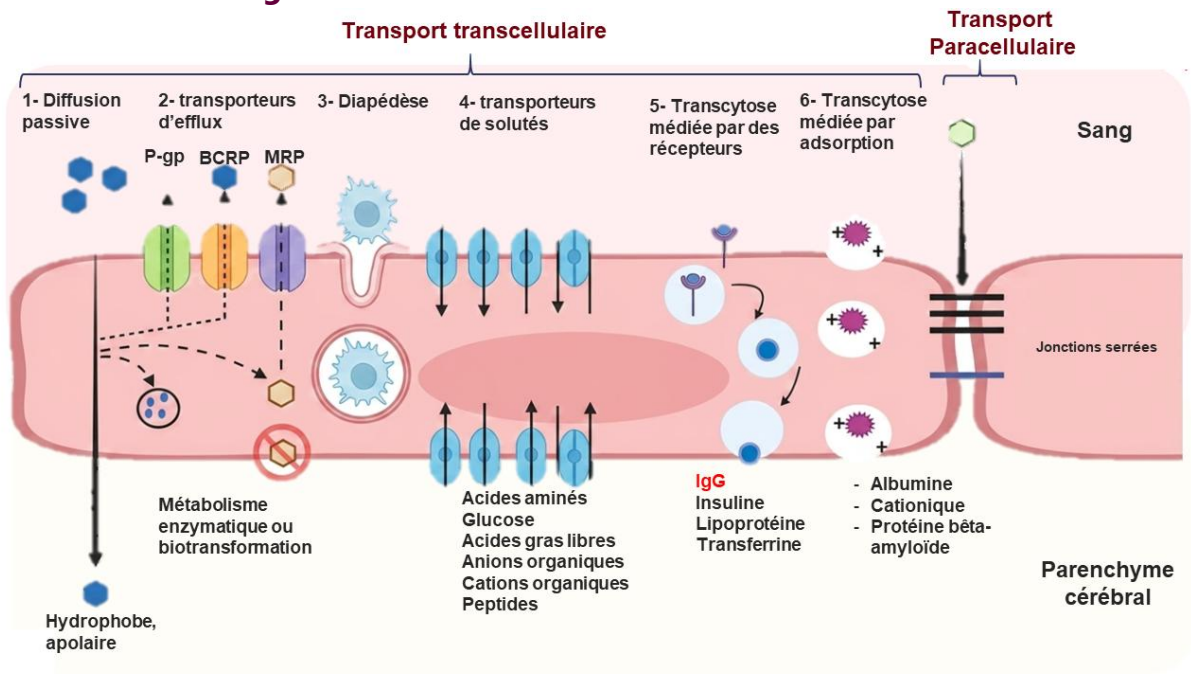



**Figure 7: Mécanismes de transport des molécules à travers la barrière hémato-encéphalique.** Les différentes voies de passage des molécules à travers la BBB, les voies paracellulaires et transcellulaires notamment la diffusion passive, les transporteurs d'influx et d'efflux, la diapédèse, la transcytose par récepteur, la transcytose par adsorption et le transport paracellulaire. (Créée avec biorender).

Bien que la BHE soit hautement sélective, le cerveau présente des besoins métaboliques élevés, nécessitant un apport continu en nutriments indispensables à son bon fonctionnement et au maintien de l'homéostasie cérébrale. Différents systèmes de transports spécialisés permettent ainsi l'apport des nutriments et l'élimination des déchets métaboliques. La voie de passage des molécules à travers la BHE dépend essentiellement de plusieurs paramètres physico-chimiques, notamment leur taille, leur structure chimique, leur lipophilie, leur degré d'ionisation et leurs capacités de liaison aux protéines plasmatiques et aux tissus cérébraux. Les mécanismes de passages à travers la BHE peuvent être classés en cinq catégories principales (figure 7) [92–94] :

(1) **La diffusion passive transcellulaire** : réservée principalement aux petites molécules lipophiles (moins de 400-500 Da), telles que l'oxygène qui diffusent selon leur gradient de concentration.

(2) **La voie paracellulaire**, très limité au niveau de la BHE du fait de la présence de « *tight junction* » jonctions serrées entre les CEC, et donc réservée au passage des petites molécules hydrophiles.

(3) **Le transport actif de solutés (SLC),** assuré par des protéines membranaires (transporteurs) spécifiques permettant l'influx ou l'efflux de molécules selon leur localisation sur la face luminale ou basolatérale des CEC. C'est le cas notamment des transporteurs du glucose (GLUT 1), des acides aminés (LAT1 et LAT2) ainsi que les pompes à efflux comme la P-glycoprotéine (P-gp) et la BCRP, impliquées dans l'élimination de plusieurs médicaments hors du cerveau.

(4) **La transcytose médiée par des récepteurs (RMT)**, C'est le cas du récepteur à insuline et de la transferrine qui assure le transport transcellulaire des macromolécules par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques, suivi de leur internalisation dans des endosomes permettant leur transfert d'un côté de la cellule à l'autre.

(5) **La transcytose médiée par adsorption (AMT),** qui repose sur des interactions électrostatiques entre les molécules chargées positivement et la charge négative à la surface des cellules endothéliales, entrainant leur internalisation sous forme d'endosomes qui migrent à travers la cellule endothéliale jusqu'à la surface abluminale, où leur contenu est libéré dans le parenchyme cérébral par exocytose.

### B.2.2 Transport des macromolécules thérapeutiques

En raison de leur grande taille et de leur capacité limitée à traverser passivement les membranes cellulaires, ces molécules dépendent principalement de mécanismes de transport vésiculaire à travers la CEC, notamment la transcytose médiée par des récepteurs (RMT) et la transcytose médiée par adsorption (AMT) [93].

Dans le cas de la RMT, la liaison d'une macromolécule à son récepteur spécifique déclenche l'endocytose. Une vésicule d'un diamètre compris entre 50 et 120 nm se forme alors ; cette dernière est internalisée, transportée à travers le cytoplasme, puis exocytée au pôle opposé de la cellule endothéliale. Après l'endocytose, les récepteurs sont recyclés vers la membrane plasmique [95,96].

Le mécanisme de l'AMT, en revanche, est non spécifique : il repose sur des interactions électrostatiques entre les charges positives (cationiques) de la macromolécule et les sites chargés négativement à la surface cellulaire, ce qui déclenche le processus d'endocytose sans liaison ligand-récepteur.

Dans les deux cas, pour qu'une protéine ou un peptide atteigne sa destination en étant fonctionnelle, la vésicule d'endocytose doit éviter le compartiment lysosomal, chargé de dégrader le contenu vésiculaire. Trois types principaux de vésicules interviennent dans ces processus : les vésicules recouvertes de clathrine (les plus nombreuses), les cavéoles (les plus petites) et les grandes vésicules macropinocytaires contenant du liquide [95,96]. Dans le cadre du RMT, ce sont principalement les vésicules recouvertes de clathrine, et dans une moindre mesure les cavéoles, qui sont mobilisées.

Ce processus reste toutefois limité, car le nombre de vésicules est particulièrement faible dans l'endothélium cérébral de la BHE adulte en conditions non pathologiques. Bien qu'une activité vésiculaire accrue ait été mise en évidence au niveau de la BHL, cela ne se traduit pas par une augmentation de la perméabilité aux macromolécules vers le parenchyme cérébral [97]. L'implication de cette différence dans la proportion de vésicules endocytiques entre la BHE et la BHL dans le transport des macromolécules entre le sang et le LCR ou inversement reste à élucider.

Au niveau la BHL, les cellules épithéliales du plexus choroïde et de la membrane arachnoïdienne permettent un passage indirect et limité des protéines plasmatiques dans le LCR, par des fuites paracellulaires à travers des jonctions non complètement étanches, ainsi que par pinocytose transcellulaire [98]. Le ratio LCR/sérum de l'IgG mesuré cliniquement est d'environ 0,003 à l'équilibre [98]. Cependant, la présence d'IgG dans le LCR n'indique pas leur passage à travers la BHE ni leur biodisponibilité dans le parenchyme cérébral, car l'échange de macromolécules entre les cellules du SNC et le LCR reste très limité [55].

### B.2.3 Transport des immunoglobulines et le rôle du récepteur FcRn

Parmi les macromolécules, les IgG sont une classe dont le transport à travers la BHE bien que connu pour être très faible du sang vers le parenchyme cérébral reste complexe. En effet, les mécanismes d'efflux spécifiques d'IgG du cerveau vers le sang médié par les récepteurs Fc ont été décrits dans plusieurs études depuis la fin des années 1990 [57,99]. Ce phénomène contribue à l'élimination des IgG du compartiment cérébral vers la circulation sanguine, réduisant ainsi leur temps de séjour dans le SNC.

Le récepteur FcRn (récepteur Fc néonatal) fait partir de la grande famille des récepteurs Fc aux cotés des récepteurs FcR-I, FcR-II et FcR-III. Il a été initialement identifié et décrit pour son implication dans le transfert des IgG maternelles à travers l'épithélium intestinal du nouveau-né. Après la naissance, il continue d'être exprimé chez l'adulte dans plusieurs tissus, en particulier au niveau des interfaces épithéliales et endothéliales [100]. Il appartient à la famille des molécules liées au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et se compose d'une chaîne α associée à la β2-microglobuline.

L'interaction entre le récepteur FcRn et l'IgG s'effectue par l'intermédiaire du domaine Fc de l'anticorps et dépend du pH. Cette interaction IgG-FcRn est marquée ou renforcée dans les conditions de milieu légèrement acides (pH 6,0–6,5), tandis qu'elle est considérablement réduite voir même abolie à un pH neutre physiologique (≈7,0–7,5) [100]. L'acidité du milieu favorise la protonation de certains résidus d'histidine présents dans la région Fc, ce qui permet une interaction électrostatique avec le récepteur et stabilise la liaison IgG-FcRn [101]. Cette interaction pH-dépendante joue un rôle dans le mécanisme de recyclage des IgG. Le processus se déroule donc par un

enchainement de plusieurs étapes. Après leur internalisation, principalement par pinocytose non spécifique, les molécules d'IgG sont acheminées vers des compartiments endosomaux acidifiés où elles vont se lier au FcRn. Cette liaison leur permet d'échapper à la dégradation lysosomale et facilite leur recyclage ou leur transport vers un autre compartiment cellulaire [102,103]. Le FcRn contribue ainsi au maintien de la longue demi-vie plasmatique de l'IgG [103,104].

Le rôle exact du FcRn dans le transport des IgG à travers la BHE reste encore controversé. Bien que plusieurs travaux lui attribuent un rôle dans la transcytose des IgG à travers la BHE [105], son implication est très variable selon le sens du transport étudié et le mode d'administration intra-LCR ou par la voie conventionnelle intraveineuse.

D'une part, plusieurs travaux suggèrent que le FcRn participe à la régulation du transport des IgG au niveau des barrières cérébrales. Des études ont d'abord montré l'expression de ce récepteur par les cellules endothéliales cérébrales et l'épithélium des plexus choroïdes du cerveau humain cultivées *in vitro*. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par microscopie confocale, avec une colocalisation avec le transporteur de glucose GUT1 au niveau de la microvascularisation cérébrale indiquant une présence plus spécifique du récepteur dans l'endothélium capillaire cérébrale [57].

Ces résultats sont en accords avec les observations de Zhang et Pardridge (2001) qui ont montré une élimination rapide des IgG du cerveau vers le sang après une administration intracérébrale chez le rat avec une demi-vie intracérébrale de 48 minutes [99]. Cet efflux s'est avéré spécifique du fait qu'une compétition a été observée lors de la co-injection d'un isotype d'IgG, mais pas lors de la co-injection d'albumine. Aussi, cette étude a également montré une inhibition du phénomène par un ajout du fragment Fc, et non par le fragment $F(ab')_2$. Finalement, ces observations ont conduit les auteurs à suggérer l'implication des récepteurs Fc dans le phénomène d'efflux d'IgG du cerveau vers le sang [99]. Une hypothèse qui a été confirmé par les travaux de Cooper et al (2013), qui ont montré qu'un anticorps présentant une forte affinité pour le FcRn était éliminé plus rapidement du cerveau qu'un anticorps ne se liant pas à ce récepteur [105].

D'autre part, plusieurs études remettent en question l'implication significative de ce récepteur dans le transport des IgG surtout dans la direction sang vers le cerveau étant donné que plusieurs études ont montré une faible perméabilité cérébrale après une administration intraveineuse. Les travaux de Garg et al.(2009), qui comparaient les souris sauvages aux souris déficientes en FcRn ont montré qu'aucune différence significative n'était observé dans la distribution cérébrale d'un anticorps administré par voie intraveineuse [106]. Ceci permettait de conclure que le FcRn ne joue pas un rôle majeur dans le transport sang vers le cerveau des IgG. Des résultats confirmés

également par d'autres travaux n'ont pas montré l'implication majeure des FcRn ni des FcγR dans la perméabilité cérébrale des anticorps monoclonaux dans le cerveau [107].

Plus récemment, des études ont indiqué que le transport des IgG est principalement médié par une transcytose non saturable et non spécifique initiée par une endocytose en phase liquide, sans influence majeure de la FcRn. En particulier, des modèles *in vitro* utilisant des CEC dérivées de cellules pluripotentes ont démontré l'absence de compétition lors du transport des IgG, ce qui suggère que l'augmentation de la biodisponibilité cérébrale pourrait plutôt reposer sur des modifications des anticorps, telles que l'ajustement de leur point isoélectrique [108].

Ainsi, ces résultats suggèrent que le FcRn participe principalement à l'efflux des IgG cérébrales plutôt qu'à leur entrée dans le cerveau.

### B.2.4 Application au trastuzumab

Lorsque le TZB est administré par la voie conventionnelle intraveineuse, les concentrations de TZB dans le LCR sont en moyenne 300 fois inférieures à celles observées dans le plasma. Cette perméabilité limitée, est liée à des altérations des barrières physiologiques (BHE et BHL) dans le contexte pathologique de la carcinose méningée [56]. En effet, d'autres études ont montré qu'aucune concentration détectable de TZB n'a été retrouvé dans le LCR d'un patient présentant des métastases cérébrales HER2-positives, même après des administrations intraveineuses répétées à forte dose [26].

Cependant, dans le cas d'une injection intra-LCR (intrathécale ou intracérébro-ventriculaire) de TZB, une clairance rapide de ce dernier du LCR, accompagnée d'une augmentation concomitante des concentrations plasmatiques ont été observé [26]. Ce passage unidirectionnel, du compartiment cérébral vers la circulation systémique, serait médié par les récepteurs FcRn exprimés par les CEC, qui sont impliqués dans la transcytose inverse des IgG tel que décrit dans la section précédente pour le passage des IgG [57]. Le maintien des concentrations thérapeutiques de TZB suffisantes dans le LCR nécessite l'administration des doses systémiques élevées, ce qui augmente le risque de toxicité.

# C. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : UN FREIN A LA DISTRIBUTION CEREBRALE DES MOLECULES ACTIVES

## C.1 Faible perméabilité cérébrale des médicaments

La fonction protectrice de la BHE est indispensable au maintien de l'homéostasie cérébrale et au bon fonctionnement du SNC. Cependant, dans de nombreux contextes pathologiques par exemple les tumeurs cérébrales, les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de parkinson ou la sclérose en plaques, ainsi que d'autres pathologies du SNC, il est impératif que le médicament puisse atteindre sa cible dans le parenchyme cérébral et à des concentrations thérapeutiques efficaces [75].

Des auteurs estiment qu'environ 98 % des petites molécules thérapeutiques, ainsi que la quasi-totalité des macromolécules médicamenteuses ne franchissent pas la BHE. Dans le cas des anticorps thérapeutiques administrés par voie intraveineuse, seule une infime fraction inférieure à 0,1 % de la dose injectée atteint le parenchyme cérébral [109]. La biodisponibilité cérébrale des IgG thérapeutiques est souvent surestimée en assimilant les concentrations dans le LCR à celles du parenchyme cérébral [110]. Cependant, le LCR est séparé du sang par la barrière sang-LCR (BHL) relativement perméable, comparativement à l'endothélium capillaire du parenchyme cérébral ou BHE qui sépare le liquide interstitiel du sang et qui est beaucoup plus restrictive. Bien que la concentration des IgG dans le LCR puisse atteindre 0,2 à 0,25 % des concentrations plasmatiques, leur perméabilité réelle dans le parenchyme cérébral reste extrêmement faible (0,01-0,02 % de la concentration plasmatique à l'équilibre) [70,71].

Malgré les avancées considérables réalisées dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques, les traitements actuellement disponibles en clinique restent limités. En effet, plusieurs molécules ayant démontré des résultats prometteurs *in vitro*, présentent une faible pénétration cérébrale. Afin d'atteindre des concentrations thérapeutiques efficaces dans le cerveau, certaines d'entre elles notamment les anticorps thérapeutiques sont administrés à des doses élevées ou selon des approches invasives, exposant ainsi à des risques de toxicité systémique. Par ailleurs, les traitements actuellement utilisés restent, dans de nombreux cas, principalement symptomatiques plutôt que curatifs [75].

En plus de cette limite majeure liée à l'imperméabilité physique de la BHE, la biodisponibilité cérébrale de certaines molécules peut être davantage réduite par d'autres mécanismes secondaires biologiques. D'une part, les transporteurs d'efflux

comme la P-gp, la BCRP comme cela a été observé pour la digoxine, la cyclosporine A, certains anticancéreux ou encore plusieurs antiépileptiques [112]. D'autre part, le métabolisme enzymatique présent au niveau de la BHE et du tissu cérébral, avec des enzymes comme les peptidases, cholinestérases, le cytochrome P450 peut entrainer la dégradation de certains xénobiotiques [113]. Dans ce contexte, l'amélioration de la perméabilité cérébrale et de la biodistribution des molécules thérapeutiques représentent aujourd'hui un défi majeur pour la recherche en neuropharmacologie.

## C.2 la barrière hémato-encéphalique en conditions pathologiques

Certaines pathologies du SNC, et notamment les tumeurs cérébrales, induisent une altération de la BHE dans leur mécanisme physiopathologique. La croissance tumorale, en comprimant les vaisseaux dans l'espace intracrânien restreint, perturbe le flux sanguin, y compris dans les régions péritumorales [114]. Pour répondre aux besoins métaboliques croissants des cellules cancéreuses en prolifération, la tumeur recrute les vaisseaux existants et induit la formation de nouveaux vaisseaux par angiogenèse, ce qui entraîne une vascularisation structurellement et fonctionnellement anormale, dont les propriétés diffèrent entre le centre et la périphérie de la lésion [114,115]. Cette néovascularisation pathologique, observée aussi bien dans les tumeurs primitives telles que le glioblastome que dans les métastases cérébrales des cancers du poumon, du sein ou du mélanome, est liée à la formation d'une nouvelle interface vasculaire appelée barrière hémato-tumorale (BHT) [7,114,115]. Ces anomalies de la vascularisation tumorale ont également été observées dans les tumeurs solides extracérébrales. Caractérisées par une hyperperméabilité vasculaire et un drainage lymphatique altéré, elles sont responsables de l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention), décrit pour la première fois par Matsumura et Maeda en 1986 [116]. Cet effet favorise l'extravasation et la rétention de macromolécules et de nanoparticules dans les tissus tumoraux, constituant ainsi l'un des fondements du ciblage passif en nanomédecine anticancéreuse [116,117].

Sur le plan structural, la BHT diffère de la BHE saine par une distribution anormale des péricytes, une perte des pieds astrocytaires et des connexions neuronales, ainsi qu'une diminution des protéines des jonctions serrées dans les cellules endothéliales. Au niveau moléculaire, ces modifications structurales sont associées à la surexpression du VEGF et du CD31 dans les cellules endothéliales tumorales. L'activation de la voie MAP kinase par le VEGF diminue l'expression de plusieurs protéines des jonctions serrées, notamment la claudine-1, la claudine-5 et l'occludine (55 kDa), ce qui contribue directement à l'augmentation de la perméabilité vasculaire [118]. La figure 8 résume les principales caractéristiques de la BHE et de la BHT.

Ces altérations empêchent la restauration complète d'une BHE fonctionnelle dans les métastases cérébrales [114,115]. Bien que la BHT soit généralement considérée comme plus perméable que la BHE intacte, son impact sur l'administration d'agents thérapeutiques reste très controversé [115,119]. En effet, cette barrière est caractérisée par une **hétérogénéité marquée** : sa perméabilité aux petites et macromolécules est non uniforme, et les mécanismes d'efflux actifs restent fonctionnels [114,115].

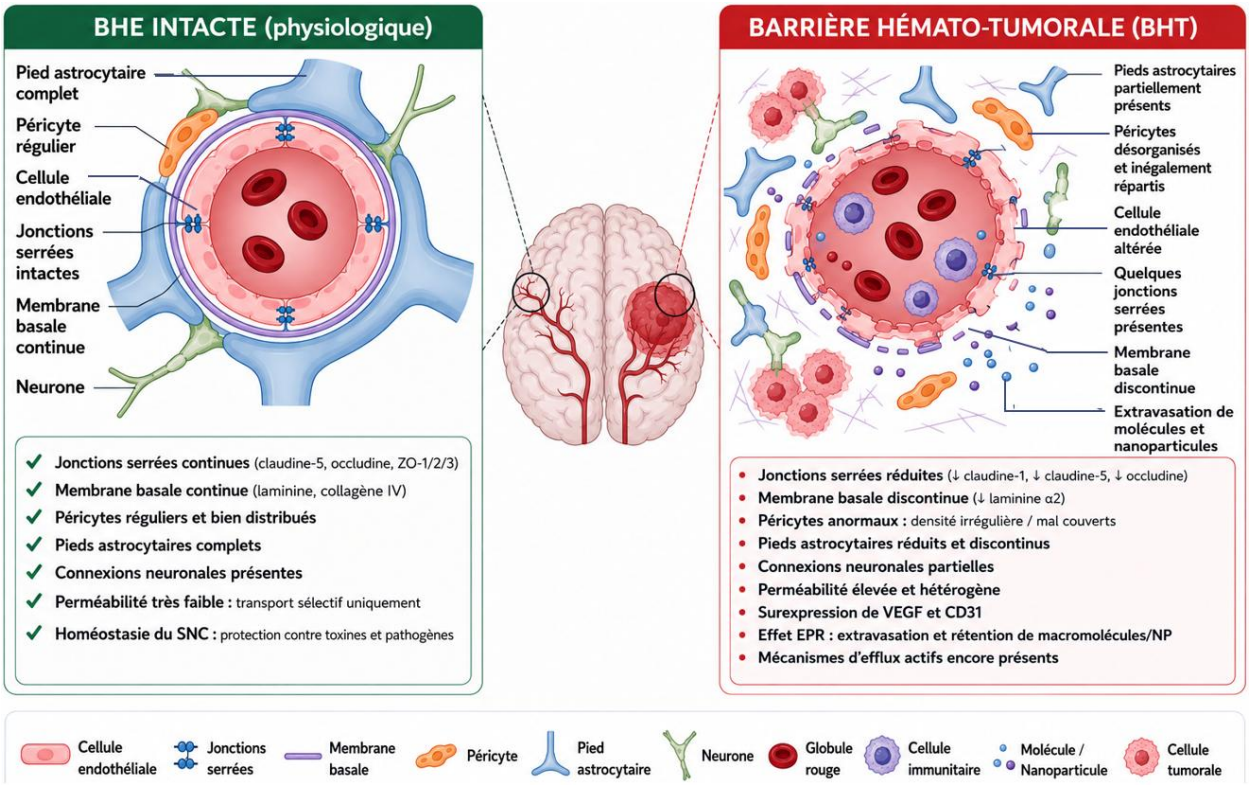



**Figure 8: Différences structurelles et fonctionnelles entre la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière hémato-tumorale (BHT).** La BHT présente une désorganisation de l'unité neurovasculaire, une réduction des jonctions serrées, une membrane basale discontinue et une perméabilité accrue favorisant l'extravasation des cellules tumorales, des macromolécules et des nanoparticules. (Inspirée des publications de Arvanitis, 2020 [114] et de Angeli, 2019 [118]).

Une étude *in vivo* sur des modèles de métastases cérébrales de cancer du sein triple négatif a illustré cette complexité : aucune corrélation n'a pu être établie entre la perméabilité vasculaire et la taille de la lésion. Certaines petites lésions diffuses ont montré une augmentation de plus de dix fois de leur perméabilité, tandis que certaines tumeurs volumineuses et compactes n'ont montré qu'une augmentation limitée [119]. Environ 10 % seulement des lésions tumorales présentaient une perméabilité réellement accrue, et la perméabilité moyenne au BHT n'atteignait que 2 à 5 % de celle des tumeurs mammaires périphériques dépourvues de BHE. Les concentrations de médicament dans les métastases cérébrales perméables n'atteignaient qu'environ 1 000 ng/g, contre 10 000 à 100 000 ng/g dans les lésions extracérébrales [119]. Ces résultats mettent en évidence une limitation majeure de l'effet EPR dans les tumeurs

cérébrales, contrairement aux tumeurs solides extracérébrales, où l'hyperperméabilité vasculaire favorise l'accumulation passive des nanomédicaments. Ces données indiquent que la présence d'une métastase cérébrale ne doit pas être interprétée comme une preuve d'absence de fonction de barrière, et que le BHT conserve une fonctionnalité résiduelle suffisante pour maintenir les chimiothérapies à des concentrations inférieures aux concentrations thérapeutiques au sein du SNC, justifiant ainsi la nécessité de développer des stratégies capables de franchir ou de contourner cette interface [119].

# CHAPITRE 3 : STRATEGIES EXISTANTES POUR AMELIORER LA BIODISTRIBUTION INTRACEREBRALE DES MOLECULES ACTIVES

Améliorer la biodisponibilité cérébrale des molécules thérapeutiques nécessite la mise en place de stratégies appropriées pour surmonter les limitations imposées par les barrières du système nerveux central. Les nombreuses approches développées ou actuellement explorées dans la littérature prouvent la complexité de cet obstacle biologique et la difficulté d'assurer une administration efficace des médicaments au parenchyme cérébral. Ces stratégies peuvent être mises en œuvre à différentes étapes du cycle de développement des médicaments : de la conception moléculaire aux modifications structurales telles que la synthèse de prodrogues ou la conjugaison chimique ; au stade biopharmaceutique, par l'optimisation de la formulation ou la sélection de voies d'administration alternatives ; ou encore par des approches biochimiques et biophysiques agissant directement sur les propriétés des barrières (Figures 9).

Ces différentes approches peuvent être classées selon plusieurs critères, notamment leur caractère invasif ou non-invasif, ou leur mécanisme d'action. Dans cette thèse, nous avons choisi de présenter ces stratégies selon leur principe de fonctionnement. Ainsi, nous les classons en trois stratégies principales : la modification des propriétés physico-chimiques et/ou de transport des molécules thérapeutiques, la perturbation transitoire de la BHE et les méthodes de contournement de la BHE. La figure 9 présente une vue d'ensemble des principales stratégies d'administration cérébrale et le tableau 3 résume leurs avantages et leurs limites. Les principes et les mécanismes associés à ces différentes approches seront décrits à travers plusieurs exemples tirés de la littérature, avec une attention particulière portée à l'administration des macromolécules, et plus spécifiquement d'anticorps thérapeutiques, lorsque des données sont disponibles.

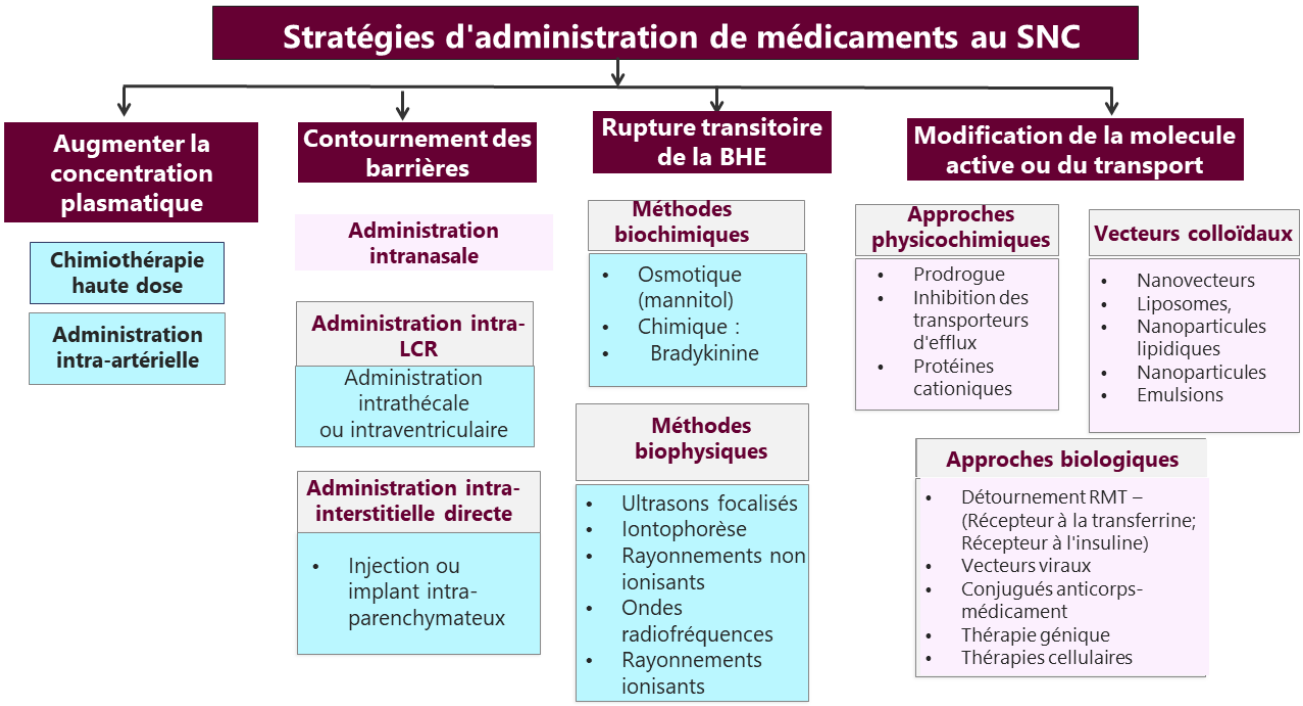



**Figure 9: Résumé des principales stratégies d'administration de médicaments au système nerveux central (SNC).** Les approches invasives sont représentées en bleu et les approches non invasives en rose.

**Tableau 3: Stratégies pour améliorer la biodisponibilité intracérébrale des molécules à faible passage de la BHE : avantages et inconvénients**

| Classe | Stratégie | Avantages | Inconvénients |
|---|---|---|---|
| Augmentation des doses systémiques | Augmentation des doses plasmatiques | Simple à mettre en place ; augmente l'exposition cérébrale locale grâce à un gradient de concentration | Toxicité systémique et effets indésirables hors cible ; efficacité limitée si la BHE reste intacte |
| Modification du médicament ou du transport | Prodrogues (lipidation) | Non invasif ; améliore la lipophilie et, par conséquent ; le transport passif de la BHE | Biodistribution hétérogène ; métabolisme et clairance systémique rapide ; risque de perte d'activité pharmacologique après conversion ; substrat potentiel des pompes à efflux |
| Modification du médicament ou du transport | Conjugaison avec des substrats de transporteurs membranaires (SLC) | Non invasif ; Très spécifique car ciblage spécifique des transporteurs d'influx endogènes | Limité aux petites molécules ; stéréospécificité ; saturation des transporteurs possible |
| Modification du médicament ou du transport | Conjugaison à des ligands pour la RMT | Non invasif ; ciblage très spécifique ; | Compétition avec les ligands endogènes ; effets hors cible sur les organes exprimant les mêmes récepteurs |
| Modification du médicament ou du transport | Vecteurs colloïdaux (Nanoparticules, liposomes, micelles, vésicules cellulaires) | Possibilité de fonctionnaliser les surfaces pour le ciblage actif ; protection du médicament contre la dégradation ; possibilité de libération contrôlée | Stabilité physico-chimique limitée ; passage de la BHE souvent insuffisant pour les macromolécules ; faible charge médicamenteuse ; risque de toxicité des excipients |
| Modification du médicament ou du transport | Vecteurs viraux | Efficacité de transfection élevée ; tropisme cellulaire spécifique et durable | Risque d'oncogenèse et de létalité ; réponse immunitaire indésirable ; fabrication complexe et coûteuse |
| Rupture transitoire de la BHE | Ouverture osmotique (par exemple, mannitol intra-artériel) | Application clinique établie ; augmentation rapide de la perméabilité | Invasif (cathéter intra-artériel) ; ouverture non sélective ; courte durée d'action ; risque de neurotoxicité et de |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | pénétration d'agents pathogènes |
| Rupture transitoire de la BHE | Ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) associés à des microbulles | Ouverture transitoire, localisée et reproductible ; potentiel d'effets biologiques intrinsèques bénéfiques (neuromodulation) | Équipement sophistiqué et coûteux ; mécanismes d'action encore partiellement compris ; surveillance *in vivo* difficile ; risque de lésions tissulaires si les paramètres ne sont pas optimisés ; invasif |
| Contournement des barrières | Administration intra-LCR : intrathécale ou intraventriculaire | Concentration élevée du médicament dans le LCR. | Procédure invasive (risque d'infection, d'hémorragie) ; faible distribution intracérébrale à partir du LCR ; élimination rapide dans la circulation systémique via les récepteurs FcRn (pour les IgG) |
| Contournement des barrières | Administration par convection renforcée (CED) | Améliore la distribution intracérébrale par flux de masse convectif ; | Invasif (stéréotaxie) ; distribution imprévisible ; optimisation complexe du cathéter ; surveillance difficile de la diffusion du médicament |
| Contournement des barrières | Implants intracérébraux à libération contrôlée (par exemple, Gliadel®) | Libération prolongée et localisée au niveau local ; exposition systémique minimale. | Invasif (implantation chirurgicale) ; distribution spatiale limitée au voisinage de l'implant ; dose totale limitée par le volume de l'implant ; risques associés à une utilisation à long terme (infection, œdème). |
| Contournement des barrières | Administration intranasale | Non invasif et simple ; transport direct vers le SNC via les voies olfactive et trigéminale ; action rapide ; biodisponibilité cérébrale accrue par rapport à la voie intraveineuse | Dégradation enzymatique par la muqueuse nasale et le mucus ; clairance mucociliaire limitant le temps de contact ; convient principalement aux molécules très actives à faibles doses ; volume administrable limité (~150 µL par narine) |

- SLC : Transport médié par les transporteurs de solutés
- RMT : transcytose médiée par les récepteurs
- FcRn : Neonatal Fc Receptor

# A. MODIFICATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET/OU DE TRANSPORT DES MOLECULES THERAPEUTIQUES

## A.1 Approches physico-chimiques

Le passage passif des molécules thérapeutiques à travers la BHE comme pour toutes les barrières physiologiques dépend principalement de leur poids moléculaire (inférieur à 400 Da) et de leur caractère lipophile. Depuis plusieurs décennies, plusieurs molécules sont modifiées chimiquement au cours de leur phase de conception afin de leur conférer des propriétés physico-chimiques compatibles avec le passage dans le SNC. C'est le cas des molécules hydrosolubles qui ont été modifiées pour les rendre plus lipophiles et donc capables de diffuser à travers la BHE par la voie transcellulaire. Plusieurs prodrogues ont été conçues en conjuguant avec des fonctions chimiques qui les rendent plus hydrophobes. Une des premières prodrogues a été l'héroïne, prodrogue liposoluble de la morphine qui a une meilleure biodisponibilité cérébrale. Cependant, cette stratégie convient plus aux petites molécules car la diffusion passive des molécules lipophiles est également dépendante de la taille des molécules.

La modification chimique ayant conduit à la formation d'une prodrogue peut permettre à la molécule d'être reconnue comme substrat par les transporteurs physiologiques, permettant ainsi son passage via les voies de transport existantes. Le traitement de la maladie de Parkinson a été révolutionné par la synthèse de la L-DOPA (levodopa), une prodrogue de la dopamine qui, contrairement à la dopamine, est capable de franchir la BHE. Grâce à sa structure chimique, elle peut être reconnue comme substrat du transporteur d'acides aminés LAT1, permettant ainsi son transport à travers la BHE via la voie transcellulaire SLC. En revanche, la lévodopa peut être métabolisée en dopamine dans les organes périphériques, limitant ainsi la quantité de prodrogue. Il a donc été nécessaire d'ajouter un inhibiteur de la décarboxylation, la carbidopa, pour protéger la lévodopa de la dégradation enzymatique par les décarboxylases périphériques. Cette molécule ne pouvant traverser la BHE, elle agit uniquement en périphérie, permettant ainsi à la lévodopa d'être transportée dans le SNC [120].

De plus, certaines macromolécules pharmaceutiques notamment les peptides ou les protéines peuvent être modifiées chimiquement pour les rendre cationiques afin de renforcer leur passage à travers la BHE par transcytose par adsorption AMT [96].

## A.2 Approches biologiques

Les mécanismes de transport de divers nutriments étant bien connus, les molécules d'intérêts peuvent être conjuguées à des molécules biologiques afin qu'elles deviennent comme ligands pour les récepteurs exprimés à la surface des « CEC ». La modification de la molécule va donc consister à la conjuguer à un ligand ou à un anticorps capable de reconnaître une cible exprimée à la surface des CEC, telle que les récepteurs de la transferrine, de l'insuline ou de la leptine, pour augmenter son passage par la voie RMT.

Pour les anticorps thérapeutiques, cette stratégie consiste à concevoir des anticorps bispécifiques « bispécific antibodies » (ABS) capables de diriger l'anticorps thérapeutique dans le parenchyme cérébral. Ce concept a été introduit dans les années 1980 à 2000 grâce aux travaux de William Pardridge [121,122]. Les premières stratégies consistaient principalement à concevoir des systèmes de conjugués chimiques associant un vecteur anticorps-cargo à une molécule thérapeutique. Comme leur nom l'indique, les ABS possèdent deux domaines de reconnaissance, capables de se lier à deux antigènes différents dans un anticorps [123]. Pour l'administration d'anticorps thérapeutiques au SNC, l'un de ces domaines est dirigé contre la cible thérapeutique cérébrale. Le second domaine permet le franchissement de la BHE en reconnaissant un récepteur exprimé à la surface des cellules endothéliales circulantes et impliqué dans la RMT [123,110]. Cette approche est actuellement l'une des stratégies les plus étudiées pour améliorer l'administration d'anticorps thérapeutiques au cerveau.

Comme décrit dans les mécanismes de transport, ce second domaine permet à l'anticorps thérapeutique d'être transporté du compartiment sanguin vers le parenchyme cérébral via un trafic vésiculaire du complexe ligand-récepteurs dans les CEC. Plusieurs systèmes RMT ont été exploités, dont les récepteurs de la transferrine (TfR), de l'insuline ou encore de la leptine dans le développement de traitements de plusieurs maladies neurodégénératives et les tumeurs métastatiques cérébrales [110].

Les ABS peuvent être construits à partir de différents formats d'anticorps, tels que les anticorps complets, les fragments d'anticorps ou encore des anticorps à domaine unique. Leur conception nécessite une ingénierie moléculaire complexe afin d'optimiser à la fois la capacité de franchissement de la BHE via une affinité adaptée avec leur cible RMT, l'activité thérapeutique et les propriétés pharmacocinétiques de l'anticorps [123].

Les ABS ont montré des résultats précliniques. Parmi les travaux pionniers, Watts et ses collaborateurs, en association avec la société Genentech, ont développé l'un des premiers ABS associant un anticorps anti-BACE1 à un anticorps murin anti-récepteur de la transferrine. BACE1 étant une enzyme, la β-sécrétase impliquée dans la

production des peptides amyloides, cette approche visait à augmenter sa biodisponibilité cérébrale dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Cette étude a démontré la capacité de cet ABS à franchir la BHE et à atteindre des concentrations thérapeutiques dans le cerveau de souris [124]. Cependant, malgré la validation de ce concept, le développement clinique n'a pas été poursuivi en raison d'une efficacité insuffisante et des effets toxiques observés avec les thérapies ciblant le BACE1. La figure 10 illustre l'évolution des principales approches mises au point pour exploiter les mécanismes de transport médiés par des récepteurs au niveau de la BHE.

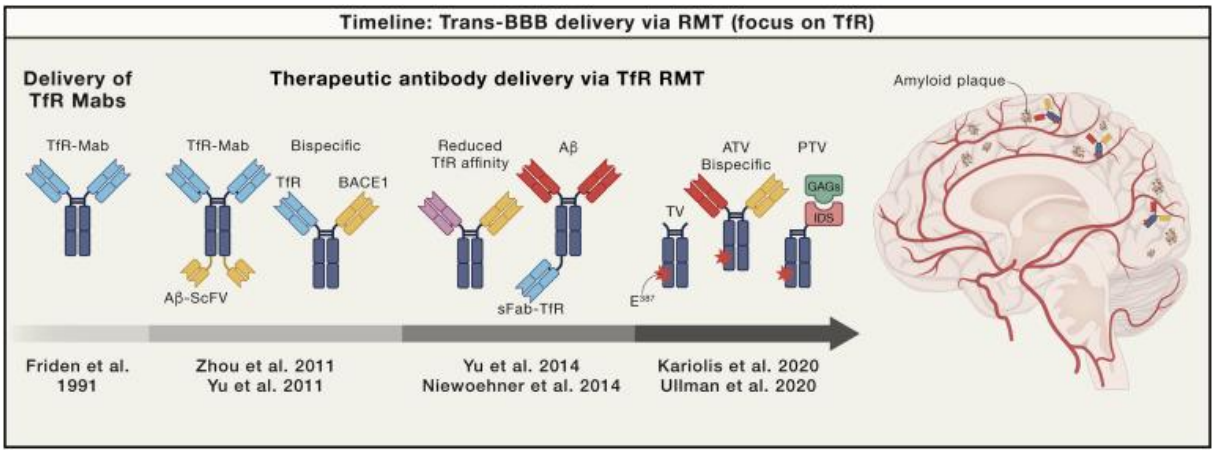



**Figure 10 : Aperçu historique des approches visant le système de transport médié par le récepteur TfR pour l'administration de médicaments à travers la BHE**. Les différentes générations d'anticorps exploitant la transcytose médiée par le récepteur de la transferrine sont présentées, notamment les anticorps anti-TfR, les anticorps bispécifiques, les anticorps à affinité réduite et les plateformes de transport cérébral de nouvelle génération [125].

Des essais cliniques récents tels qu'avec le Tontinemab, un ABS anti-amyloïde utilisant le même système de transport TfR continue en phase III (NCT07169578) dans la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, aucun anticorps bispécifique destiné à améliorer le franchissement de la BHE n'a encore été approuvé pour une application clinique dans les maladies du SNC.

Au-delà des ABS, d'autres stratégies biologiques visant à améliorer la délivrance cérébrale des anticorps thérapeutiques sont également en cours d'évaluation préclinique. On retrouve, par exemple la bioconjugaison, l'utilisation de vecteurs viraux ainsi que certaines approches de thérapie cellulaire. Dans ce contexte, le TZB a été conjugué à la mélanotransferrine afin de générer le conjugué BT2111, utilisant la technologie Transcend®. Cette plateforme exploite les mécanismes de RMT pour les récepteurs de lipoprotéines de faible densité afin de transporter le TZB à travers la BHE. Des études précliniques chez la souris ont montré que cette approche permettait d'augmenter de 10 à 15 fois les concentrations cérébrales de TZB dans le parenchyme cérébral, avec une réduction concomitante des métastases cérébrales HER2 positives [126].

Par ailleurs, la modification du format moléculaire des anticorps représente une autre stratégie prometteuse pour optimiser leur pharmacocinétique cérébrale. L'utilisation de fragments d'anticorps tels que les fragments Fab ou les scFv est explorée afin d'améliorer leur diffusion dans le tissu cérébral et de limiter certains mécanismes de clairance associés aux IgG entiers. Dans le cas du TZB, Angeli et collaborateur ont proposé une approche consistant à administrer par voie intrathécale un fragment Fab du trastuzumab (Fab-TZB) en remplacement de l'anticorps entier. Cette stratégie repose sur l'hypothèse selon laquelle la clairance rapide du TZB entier administré dans le LCR observée en moins de vingt minutes serait médiée par le récepteur FcRn, responsable du transport des immunoglobulines via leur domaine Fc. Le fragment Fab, dépourvu de région Fc, pourrait ainsi échapper à cette clairance vers la circulation sanguine. Les résultats obtenus chez le rat ont montré une réduction de l'efflux cérébral d'environ un facteur dix par rapport au TZB entier [127].

## A.3 Vectorisation dans les systèmes colloïdaux de délivrance de médicaments

### A.3.1 Définition et fonctions

Les systèmes nanoparticulaires colloïdaux constituent une des approches les plus étudiées pour améliorer le transport d'agents thérapeutiques à travers la BHE. Ces systèmes reposent sur l'utilisation de nanovecteurs (taille de 1 à 1000 nm de diamètre) capables d'encapsuler des molécules thérapeutiques et d'en modifier la pharmacocinétique ainsi que la biodistribution cérébrale.

La vectorisation nanoparticulaire peut remplir plusieurs fonctions essentielles dans le devenir d'une molécule active. Un nanovecteur peut permettre de protéger les molécules sensibles contre la dégradation enzymatique ou la métabolisation précoce, d'améliorer la stabilité dans la circulation, de favoriser l'internalisation cellulaire et d'augmenter leur capacité à franchir certaines barrières biologiques. De plus, il peut également permettre un ciblage des tissus d'intérêt ainsi qu'un contrôle de la libération dans le temps et l'espace.

### A.3.2 Différentes générations

Selon leur degré d'évolution technologique biopharmaceutique, les nanovecteurs sont classés en quatre générations [128] (figure 11).

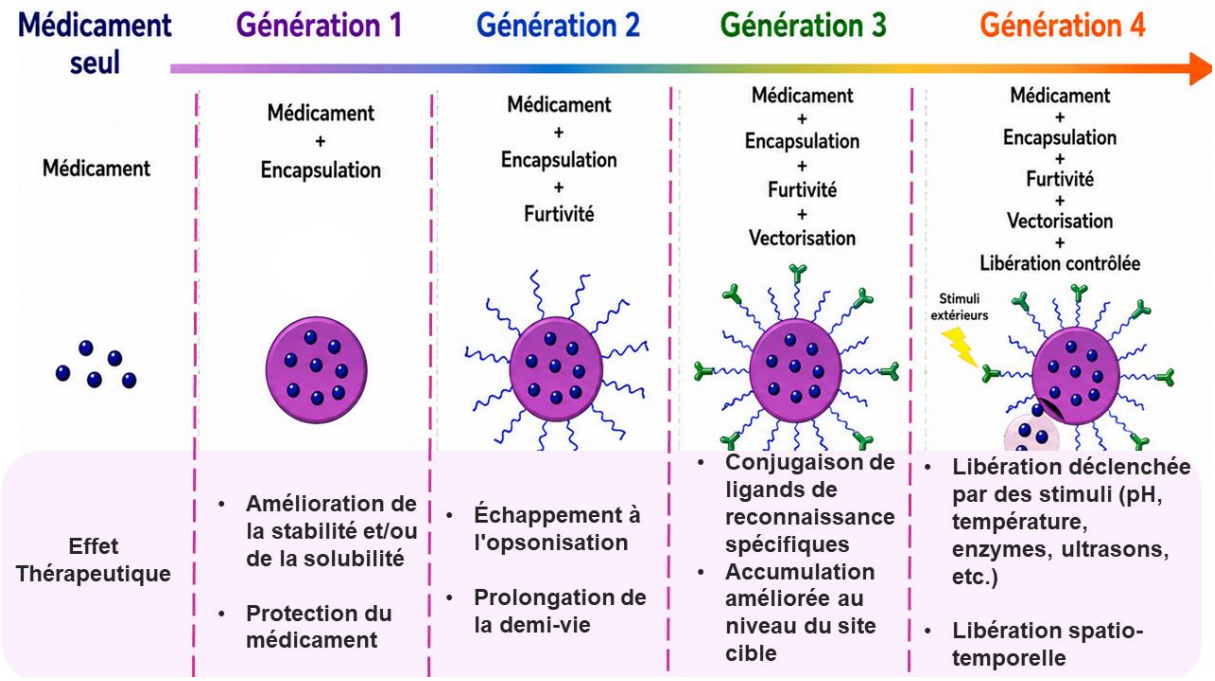



**Figure 11 : Évolution des générations de nanovecteurs**. (Inspiré de Halima Alem [129]).

Les nanoparticules de **première génération** : administrées par voie intraveineuse, elles sont rapidement reconnues et éliminées par le système réticulo-endothélial en raison de l'opsonisation de leur surface par des protéines plasmatiques (opsonines) induisant un tropisme préférentiel pour le foie et la rate.

Les nanoparticules de **deuxième génération :** Afin de limiter le phénomène de tropisme, des nanoparticules dites « furtives » ont été développées par un greffage de polymères hydrophiles, le polyéthylèneglycol (PEG), permettant de réduire les interactions avec les protéines plasmatiques et d'augmenter leur temps de circulation sanguine.

Les nanoparticules de **troisième génération :** elles reposent sur les stratégies d'adressage moléculaire impliquant la fonctionnalisation de surface des nanoparticules PEGylées par des ligands spécifiques, capables de reconnaitre des récepteurs surexprimés à la surface de certaines cellules cibles.

Les nanoparticules de **quatrième génération** : ce sont des systèmes capables de moduler la libération du médicament en réponse à des stimuli internes ou externes (pH, températures, enzymes, ultrasons, champ magnétique), permettant ainsi une délivrance contrôlée au site thérapeutique.

### A.3.3 Nanovecteur pour le franchissement de la BHE

Afin de franchir la BHE, différents types de nanovecteurs ont été développés. Ceux-ci peuvent être d'origine naturelle ou synthétique et sont classés selon divers critères (figure 12). Les molécules actives peuvent être associées à ces nanovecteurs, par adsorption à leur surface, encapsulation au sein de la matrice de nanoparticule ou par conjugaison covalente. Parmi les principaux systèmes étudiés, on retrouve les liposomes, les micelles, les nanoparticules polymériques telles que les poly(alkylcyanoacrylates), les poly(ε-caprolactone) ou encore les poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), les nanoparticules inorganiques (or, dioxyde de silicium), les nanoparticules lipidiques (les nanoparticules lipidiques solubles SLNP), les dendrimères, et les vésicules extracellulaires (exosomes) [130].

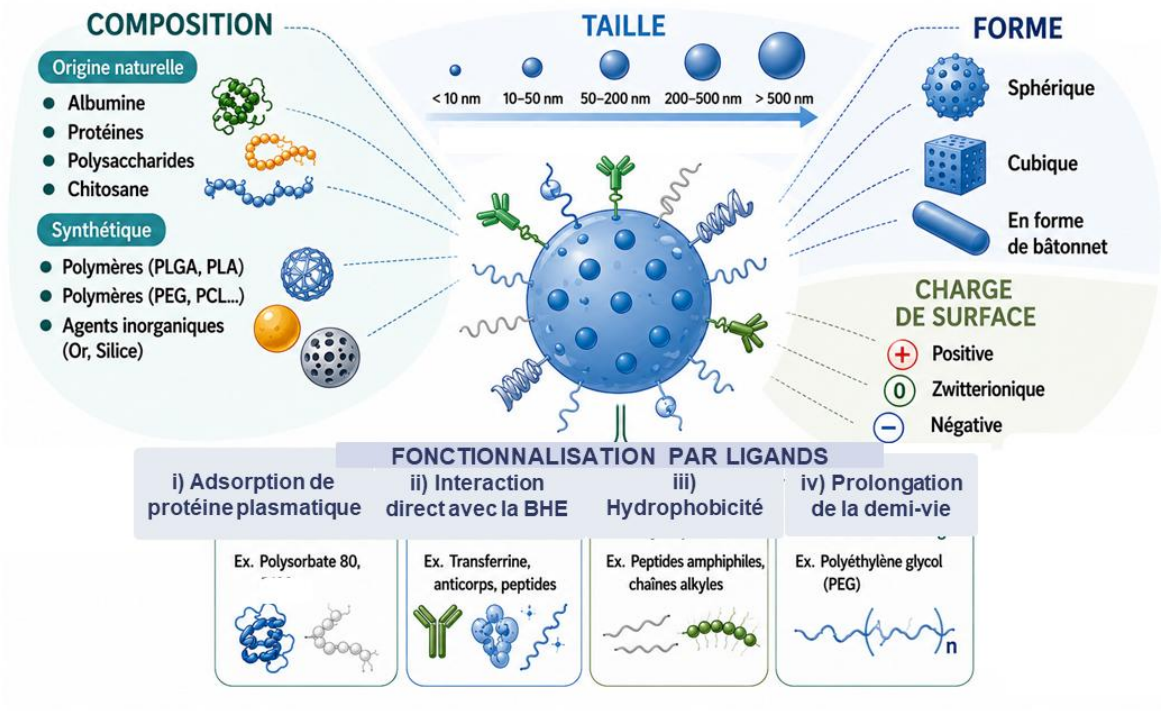



**Figure 12: Principales caractéristiques des nanoparticules (NP) qui influencent leur distribution systémique et leur capacité à traverser la BHE.** Les NP peuvent être d'origine naturelle, à base de molécules, de protéines, de polysaccharides ou de chitosane ; ou synthétiques, à partir de polymères tels que l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) ou l'acide poly(lactique) (PLA), voire d'agents inorganiques comme l'or ou la silice. Les nanoparticules présentent également une grande variété de formes (sphériques, cubiques, en forme de bâtonnet) et de charges de surface (négatives, zwitterioniques, positives). Elles peuvent être fonctionnalisées par différents types de ligands, regroupés en quatre catégories : (i) les ligands qui favorisent l'adsorption des protéines plasmatiques (par exemple, le polysorbate 80) ; (ii) les ligands qui interagissent directement avec la BHE par exemple, la transferrine, les anticorps, les peptides) ; (iii) les ligands qui augmentent l'hydrophobicité de surface (par exemple, les peptides amphiphiles) ; et (iv) les ligands qui prolongent la durée de vie du sang (par exemple, le polyéthylène glycol, PEG) [131].

L'efficacité de ces nanoparticules dépend fortement de leurs propriétés physico-chimiques, notamment leur composition, leur forme, leur taille, leur hydrophobicité, leur charge de surface, la présence et la nature de leur revêtement de surface, ainsi que de la nature de leurs ligands de surface [131]. Ces facteurs influencent directement la nature des interactions avec la BHE et sont donc déterminants du mécanisme de transport impliqué. Les systèmes nanoparticulaires peuvent agir par ouvertures des jonction serrées entre les CEC, par transcytose médiée par récepteur (RMT) ou par adsorption (AMT), voir par combinaison de plusieurs de ces mécanismes. Ainsi, afin d'améliorer le ciblage du SNC, de nombreuses nanoparticules ont été fonctionnalisées par des ligands biologiques capables d'interagir avec des récepteurs exprimés au niveau de l'endothélium cérébral. Parmi ces ligands, on retrouve majoritairement, la transferrine, certaines lipoprotéines, des peptides ou des anticorps.

A partir d'une analyse bibliographique, Sarkar et al. (2017) ont défini les caractéristiques idéales d'un nanovecteur pour l'administration cérébrale de médicaments [132]. En termes de biocompatibilité, le vecteur doit être non toxique, non immunogène, non inflammatoire, biocompatible et biodégradable. Sur le plan physico-chimique, un diamètre inférieur à 200 nm, associé à une distribution granulométrique étroite, est nécessaire pour une bonne diffusion tissulaire et limiter la capture par le système réticulo-endothélial. Le nanovecteur devrait présenter une stabilité suffisante dans les milieux biologiques, par exemple ne s'agrégeant pas, ni ne se dissociant pas précocement et n'étant pas sujet à l'opsonisation, afin de prolonger sa demi-vie circulante. La fonctionnalisation de surface par des ligands ciblant la BHE est essentielle pour permettre la transcytose à travers la BHE. Le système devrait également permettre une libération contrôlée du médicament et être applicable au transport d'une large gamme de molécules thérapeutiques, notamment les anticorps, les peptides, les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides et les petites molécules. Enfin, il devrait permettre une production à l'échelle industrielle avec une faisabilité économique.

### A.3.4 Résultats des études précliniques et cliniques

Les nanoparticules lipidiques (LNP) constituent actuellement l'une des principales stratégies développées pour l'administration cérébrale de macromolécules thérapeutiques. Plusieurs études récentes ont démontré la capacité de certaines formulations de LNP à traverser la BHE après une administration systémique et à assurer une délivrance efficace d'ARN thérapeutiques au SNC [133]. Ces nanosystèmes sont étudiés dans le cadre de diverses pathologies neurologiques, notamment les maladies neurodégénératives, les glioblastomes et certaines maladies génétiques du SNC. Cependant, malgré des résultats précliniques prometteurs et des progrès technologiques constants dans le domaine des nanosystèmes, leur application clinique demeure limitée.

Quelques thérapies à base de nanoparticules pour d'autres indications ont été approuvées cliniquement, mais aucune formulation de nanoparticules spécifiquement conçue pour la délivrance cérébrale n'a encore été commercialisée. Cette limitation s'explique notamment par des difficultés liées à l'immunogénicité, à la reproductibilité des procédés de fabrication et au manque de données robustes concernant leur biodistribution cérébrale réelle. Il est essentiel de démontrer la capacité de ces systèmes à libérer leur charge thérapeutique au sein du parenchyme cérébral plutôt que de simplement induire une accumulation dans les CEC. Les applications les plus avancées concernent principalement les tumeurs cérébrales, où une rupture locale de la barrière BHE peut faciliter l'accumulation des nanoparticules. En revanche, dans les pathologies caractérisées par une BHE fonctionnellement intacte, les nanoparticules non ciblées (surface non conjuguée à un ligand) présentent une efficacité de pénétration cérébrale limitée. Cette limitation a conduit au développement de nanoparticules de troisième génération, fonctionnalisées par des ligands de ciblage capables d'exploiter les mécanismes physiologiques de la RMT [130]. Li et al. ont montré que la PEGylation de nanoparticules de PLGA chargées en shikonine, un médicament anticancéreux, prolongeait leur demi-vie plasmatique de 1,73 fois par rapport à la molécule libre, grâce à son effet furtif sur le système réticulo-endothélial. Une fonctionnalisation supplémentaire par la lactoferrine a permis d'atteindre des concentrations cérébrales significativement plus élevées jusqu'à 4,4 fois supérieures en 2 heures en comparaison aux nanoparticules non fonctionnalisées, en exploitant la transcytose médiée par le récepteur de la lactoferrine exprimé à la fois sur les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique et sur les cellules de glioblastome [134].

# B. PERTURBATION TRANSITOIRE DE LA BHE

C'est une approche directe visant à perturber l'intégrité de la BHE par différentes approches biochimiques ou biophysiques.

## B.1 Méthodes physiques d'ouverture transitoire de la BHE

L'ultrason focalisé est basé sur le principe selon lequel, l'énergie acoustique peut être concentrée en un point focal de quelques millimètres de diamètre, n'exposant ainsi qu'un faible volume tissulaire. Lorsqu'on l'associe à l'IRM (imagerie à résonnance magnétique, cela produit une cartographie thermique en temps réel lors de la sonication et donc par conséquent permet de guider et d'agir de façon ciblée. Les ultrasons focalisés associés à des microbulles constituent une approche émergente permettant d'augmenter de façon transitoire et localisée la perméabilité de la BHE afin d'améliorer la délivrance dans le parenchyme cérébrale des biomédicaments. L'utilisation de cette technique entraine des modifications transitoires de la perméabilité membranaire cellulaire ou la rupture de la BHE [135]. Des études ont montré que les ultrasons induisent la perméabilité à travers les barrières biologiques par plusieurs mécanismes : Sheikov et al. (2004) ont identifié de multiples voies transcapillaires, notamment la transcytose, la fenestration, la formation de canaux et l'ouverture des jonctions serrées [136]. Robyn Schlicher et al. (2006) ont démontré que la sonication crée des micro-déchirures ou des cavités réparables dans la membrane plasmique, permettant l'absorption de macromolécules jusqu'à 28 nm de rayon [137]. Brandon Helfield et al. (2016) ont confirmé que les oscillations de microbulles génèrent des pores membranaires à travers les couches apicale et basale de la membrane cellulaire, avec des temps de refermeture inférieurs à 2 minutes. Ces données suggèrent que la sonoporation est le mécanisme central de la perméabilisation cellulaire induite par les ultrasons [138].

Plusieurs études précliniques menées au cours des vingt dernières années ont démontré l'intérêt des ultrasons focalisés pour améliorer la délivrance cérébrale d'anticorps thérapeutiques. Une étude réalisée chez la souris en 2006 a notamment montré que l'ouverture localisée de la BHE par ultrasons focalisés guidés par IRM (MRgFUS) permettait une délivrance ciblée d'un anticorps anti-récepteur D4 de la dopamine uniquement dans les régions cérébrales soumises à la sonication [139]. Cette perturbation transitoire de la barrière hémato-encéphalique était réversible et n'entraînait pas d'effets indésirables significatifs. Une autre étude a également montré, chez des rats sains, que cette stratégie augmentait significativement la perméabilité cérébrale aux molécules de chimiothérapie [88].

Des premiers essais cliniques ont montré la faisabilité et la sécurité de l'ouverture transitoire de la BHE par MRgFUS. Les premières données cliniques chez l'humain concernant l'administration de trastuzumab par ultrasons focalisés dans le traitement des métastases cérébrales proviennent de l'étude clinique (NCT03714243) de Y. Meng et al. (2021), une étude marquante ayant démontré l'innocuité et l'efficacité de cette technique chez 4 patientes atteintes de métastases cérébrales HER2-positives. Y. Meng et al. (2021) ont administré 20 traitements par MRgFUS associés à du trastuzumab par voie intraveineuse à ces 4 patientes. Les lésions traitées par MRgFUS ont présenté une augmentation de 101 ± 71 % du rapport de fixation standardisée (SUV) contre -18 ± 26 % pour les lésions témoins, sans aucun effet indésirable grave [141].

## B.2 Méthodes chimiques d'ouverture transitoire de la BHE

Les méthodes chimiques reposent sur l'usage des molécules qui vont agir par des mécanismes différents pour induire l'ouverture de la BHE. L'une d'elles consiste notamment à l'ouverture osmotique de la BHE par la perfusion intracarotide d'une solution hypertonique d'agents osmotiques comme le mannitol ou l'arabinose pour augmenter le passage des molécules à travers la BHE [142]. Ces solutions induisent la vasodilatation des capillaires et un rétrécissement des cellules endothéliales CEC engendrant un élargissement des jonctions serrées des CEC. Cette méthode a été appliquée pour les molécules hydrosolubles et de grandes tailles notamment les peptides, les anticorps monoclonaux , les enzymes et les anticancéreux comme le méthotrexate [142]. Une étude de Rapoport et al. a montré que l'ouverture osmotique de la BHE augmentait d'environ dix fois la perméabilité cérébrale aux substances intravasculaires, permettant ainsi le passage simultané de peptides et d'anticorps thérapeutiques. Cette perméabilité est inversée en grande partie en moins de 10 minutes [142]. Plus récemment, une étude préclinique menée sur des souris a rapporté qu'environ 33,9 % de la dose injectée d'un anticorps monoclonal anti-VEGF pouvaient atteindre le cortex cérébral après une administration intra-artérielle associée à une ouverture osmotique de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (par perfusion de mannitol), contre seulement 3,56 % après une administration intra-artérielle seule avec une BHE intacte [143].

D'autres méthodes chimiques consistent à l'utilisation d'autres molécules comme les agonistes des kinines à l'instar de la Bradykinine ou son analogue le Labradimil (RMP-7) ou les peptides comme le DBK pour l'ouverture transitoire de la BHE. Elles sont responsables d'une cascade mécanistique induisant un remodelage transitoire et réversible des jonctions serrées augmentant la perméabilité paracellulaire des molécules [144]. Cependant, ces molécules peuvent être associées à des effets

indésirables comme l’hypotension. De plus, la durée de l’ouverture reste limitée de l’ordre de 20 à 30 minutes en plus de l’ouverture non sélective de la BHE.

Ces approches transitoires d'ouverture chimique de la BHE, qu'elles soient osmotiques ou induites par des agents vasoactifs comme la bradykinine, restent relativement peu sélectives. En effet, elles augmentent non seulement le passage des macromolécules thérapeutiques ciblées, mais aussi la diffusion d'autres composants sanguins circulants dans le parenchyme cérébral. Cette absence de sélectivité expose potentiellement le cerveau à des substances exogènes indésirables et accroît le risque de neurotoxicité. Ces limitations pourraient expliquer pourquoi, malgré des résultats précliniques encourageants, aucun essai clinique dédié à l'administration d'anticorps monoclonaux neurologiques par ces stratégies n'a encore été publié.

# C. METHODES DE CONTOURNEMENT DE LA BHE

Jusqu'à présent, les différentes stratégies d'amélioration de la biodistribution cérébrale abordées visaient principalement à faciliter le passage de la BHE, soit par une altération transitoire de son intégrité, soit par la modification des propriétés physico-chimiques des molécules thérapeutiques afin de reproduire les voies physiologiques de transport des nutriments à travers la BHE. Dans la plupart des cas, ces approches reposaient sur une administration systémique, principalement par injection intra-traveineuse. Dans cette nouvelle section, nous abordons les stratégies d'amélioration de la distribution des médicaments dans le parenchyme cérébral en contournant les limitations liées à l'administration systémique. Compte tenu de l'étendue de ce sujet, nous nous concentrerons principalement sur l'administration de macromolécules, et plus spécifiquement d'anticorps thérapeutiques. Ces approches reposent essentiellement sur l'utilisation de voies d'administration alternatives conçues pour augmenter l'exposition cérébrale au médicament. Il est important de noter, que ces stratégies peuvent être combinées à d'autres approches décrites précédemment, notamment les modifications physico-chimiques des molécules thérapeutiques.

Ces méthodes peuvent être classées en trois grandes catégories :

- Injections Intra-LCR
- Injections directes dans le parenchyme cérébral ou utilisation d'implants intracérébraux (voie intraparenchymateuse)
- La voie intranasale

La stratégie d'administration intranasale constitue l'approche centrale de cette thèse ; elle sera donc abordée dans une section dédiée afin de détailler les principes, les mécanismes et les applications potentielles dans la délivrance cérébrale de macromolécules.

## C.1 Injection intra LCR

Avant d'aborder cette voie d'administration, il est important de rappeler la physiologie du liquide céphalo-rachidien (LCR) et sa circulation. Comme décrit précédemment dans la section consacrée à la barrière sang-LCR, le LCR est principalement sécrété par les plexus choroïdes des ventricules cérébraux [145]. Il circule ensuite dans les espaces sous-arachnoïdiens selon deux directions principales : vers l'espace sous-arachnoïdien intracrânien qui entoure le cerveau, et vers l'espace sous-arachnoïdien spinal le long de la moelle épinière. Après avoir circulé autour de la moelle épinière, le LCR retourne

aux structures intracrâniennes et est finalement drainé par les villosités arachnoïdiennes vers les sinus veineux, puis vers la circulation veineuse (Figure 13) [145].

L'administration intra-LCR est considérée comme une voie « d'administration locale » de médicaments pour le traitement des maladies du SNC [146]. Historiquement, cette voie a été principalement utilisée en pratique clinique pour l'anesthésie, la prise en charge de la douleur, les tumeurs du cerveau et certaines pathologies affectant les méninges, notamment les méningites, les abcès cérébraux et la carcinomatose méningée [146]. Son principal objectif est d'augmenter les concentrations médicamenteuses dans le LCR et ainsi d'améliorer la fraction biodisponible localement.

Cette approche consiste en une injection directe dans le compartiment LCR à partir de différents sites d'accès anatomiques, qui donnent leur nom aux différentes voies d'administration : intracérébroventriculaire, intrathécale cervicale, intrathécale lombaire et intracisterna-magna. Elle est actuellement étudiée pour l'administration de nombreux types de traitements, notamment les petites molécules, les macromolécules et les thérapies géniques [145].

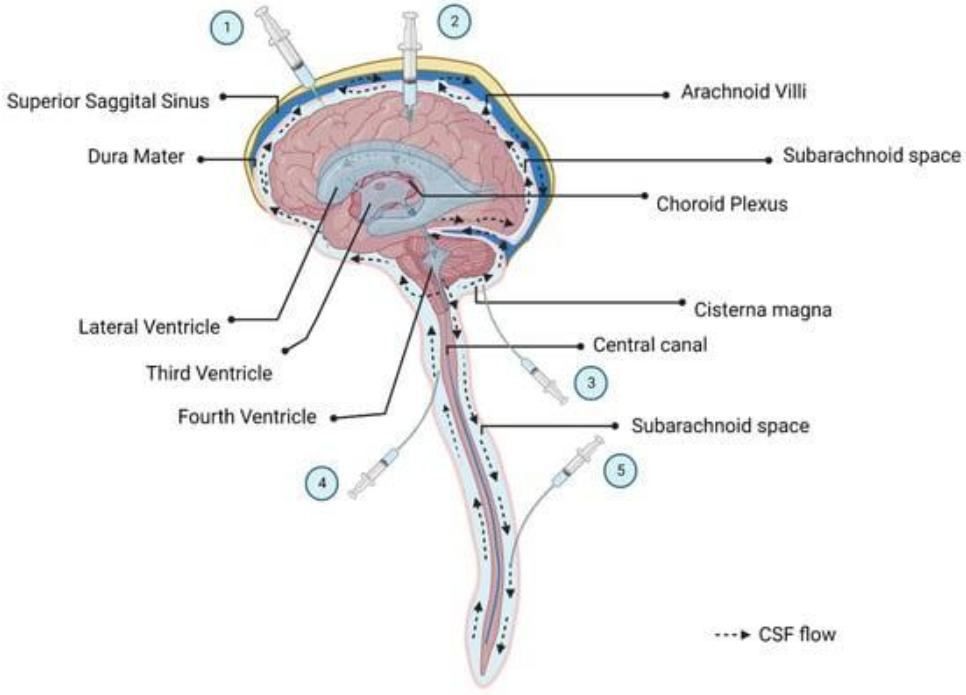



**Figure 13: Site d'administration direct dans le SNC**. 1. Administration intraparenchymateuse (IP), 2. Administration intracérébroventriculaire (ICV), 3. Intracisterna magna (ICM), 4. Injection intrathécale (IT) dans la région cervicale de la moelle épinière, 5. Injection intrathécale (IT) ; Les flèches noires indiquent la circulation normale du LCR chez l'humain. (D'après Limia et al. 2022 [145]).

Bien que cette voie soit souvent décrite comme une stratégie permettant de contourner la BHE et d'améliorer la biodisponibilité cérébrale des médicaments, cette affirmation reste controversée [147]. Il existe effectivement une proximité anatomique

entre LCR et le parenchyme cérébral. Les mécanismes impliqués dans cette voie d'administration restent insuffisamment compris. Certaines études suggèrent que l'amélioration de la distribution cérébrale repose principalement sur des phénomènes de convection au sein du tissu cérébral, tandis que d'autres études soutiennent l'hypothèse d'un transport dominé par des mécanismes de diffusion [148].

Les molécules présentes dans le LCR ne diffusent généralement pas de manière efficace et homogène dans les régions profondes du parenchyme cérébral. L'efficacité thérapeutique observée lors de l'administration intra-LCR semble être principalement obtenue lorsque les cibles thérapeutiques sont situées à proximité de surfaces directement accessibles par le LCR [148]. Les applications cliniques de cette voie d'administration comprennent les analgésiques opioïdes, qui agissent principalement sur les récepteurs opioïdes situés dans la corne dorsale de la moelle épinière, ainsi que les chimiothérapies utilisées dans la prise en charge des métastases leptoméningées. Ceci a été notamment illustré par l'utilisation du trastuzumab intrathécal dans le traitement de la carcinomatose leptoméningée HER2-positive du cancer du sein. Une revue portant sur 13 études et 17 patientes a montré que cette approche était généralement bien tolérée et associée à une amélioration de la survie [149]. Toutefois, ces études ont été menées dans des contextes pathologiques associés à une potentielle altération des barrières du SNC et n'ont pas inclus d'études pharmacocinétiques approfondies. Elles ne permettent donc pas de confirmer une distribution intraparenchymateuse globale, homogène et profonde du trastuzumab au sein du SNC. De plus, il reste difficile de généraliser ces observations, car les paramètres pharmacocinétiques associés à cette voie d'administration, notamment l'absorption, la distribution et l'élimination, peuvent varier considérablement en fonction des caractéristiques physico-chimiques des molécules thérapeutiques.

En réalité, l'administration intra-LCR contourne principalement la barrière sang-LCR (BHL), sans pour autant garantir une diffusion efficace dans le liquide interstitiel du parenchyme cérébral. Pour qu'une molécule atteigne les tissus cérébraux profonds, elle doit traverser l'endothélium cérébral et les structures associées à la BHE. Comme décrit dans les sections précédentes sur la BHL et le transport des macromolécules, l'augmentation des concentrations d'IgG ou d'autres macromolécules dans le LCR n'entraîne pas obligatoirement une augmentation du passage dans le parenchyme cérébral lorsque la BHE est intacte. L'augmentation de la perméabilité observée dans certaines études utilisant ces voies d'administration a principalement été rapportée dans le contexte de pathologies du SNC, où l'intégrité de la BHE est souvent compromise. Ainsi, la concentration d'une molécule dans le LCR n'est pas toujours un indicateur fiable de sa biodisponibilité effective dans le parenchyme cérébral.

De plus, plusieurs études ont montré qu'après administration intra-LCR, les macromolécules sont éliminées rapidement dans la circulation sanguine par des

mécanismes d'efflux, ce qui a conduit certains auteurs à qualifier cette voie d'« administration intraveineuse prolongée». Ce passage rapide du LCR vers le sang s'explique par le fait que la totalité du volume de LCR est absorbée dans le sang veineux environ 5 fois par jour [148].

Bien qu'elle offre la possibilité d'une administration directe du médicament dans le LCR, la procédure est invasive et comporte des risques, tels que l'infection, l'hémorragie et les lésions neurologiques. De plus, l'administration est techniquement complexe et peut s'avérer difficile à réaliser chez les patients présentant des variations anatomiques ou des pathologies compliquant l'accès [146]. Le développement d'alternatives plus ciblées et moins invasives, telles que l'administration intranasale de médicaments, prend de plus en plus de l'ampleur pour le traitement des maladies qui touchent le SNC. Malgré ces limitations, de nombreuses études précliniques et cliniques continuent d'évaluer le potentiel de cette stratégie pour améliorer la biodistribution cérébrale des macromolécules thérapeutiques. Cette voie d'administration peut toutefois rester pertinente dans certains contextes pathologiques ou lorsqu'elle est associée à d'autres stratégies d'optimisation. Par exemple, une étude (Angeli et al. 2024.) a montré que l'utilisation du fragment Fab-Trastuzumab permettait d'augmenter la distribution cérébrale en réduisant sa clairance rapide du LCR vers le sang [127].

## C.2 Injections intraparenchymateuse ou utilisation d'implants

Également appelée voie intracérébrale, cette approche consiste à contourner la barrière BHE par administration transcrânienne directe du médicament dans le parenchyme cérébral. Cette administration peut être réalisée soit par injection directe du médicament, soit au moyen d'implants intracérébraux, soit par des techniques de diffusion par convection (DC) [148].

Le médicament peut être administré sous forme libre ou encapsulé dans des polymères biodégradables (implants), permettant une libération progressive dans le tissu cérébral. Dans les approches d'administration intracérébrale classiques, le principal mécanisme de distribution du médicament est la diffusion. Cependant, ce mécanisme présente une limitation majeure : la concentration du médicament diminue rapidement et de façon logarithmique avec la distance au site d'administration [150]. En effet, la distance de diffusion effective dans le cerveau est généralement estimée entre 0,2 et 2 mm, aussi bien pour les petites molécules que pour les macromolécules, quelle que soit la méthode d'administration (intracrânienne ou intra-LCR) utilisée [150]. Ainsi, les régions cérébrales éloignées du site d'implantation ou d'injection restent exposées à de faibles concentrations de médicament, ce qui limite l'efficacité thérapeutique des implants intracérébraux. Pour pallier ces limitations, de nouvelles approches utilisant des

systèmes de cathéters et des techniques de perfusion assistée sont en cours de développement. Parmi les applications cliniques déjà disponibles, la carmustine sous forme d'implant intracérébral en polymère (Gliadel®) est un des exemples approuvés par la FDA depuis plus de vingt ans. Ces implants ont démontré un bénéfice clinique en augmentant la survie des patients atteints de gliomes malins d'environ 10 semaines et sont utilisés en clinique après résection chirurgicale [148].

L'administration intracérébrale par diffusion convective CED « *Convection-Enhanced Delivery* », a été développée pour pallier les limitations de la diffusion. Cette technique consiste en l'implantation intracérébrale d'un cathéter relié à une pompe générant un flux de convection destiné à améliorer la distribution du médicament dans l'espace extracellulaire cérébral [151]. Cependant, malgré plusieurs études cliniques, les résultats pharmacocinétiques ont montré que la diffusion demeure souvent le principal mécanisme de délivrance [148]. À ce jour, aucune stratégie basée sur la CED n'a abouti à une autorisation de mise sur le marché.

Globalement, les stratégies d'administration directe au système nerveux central, notamment par voie intracérébrale et intra-LCR, permettent de contourner partiellement les limitations imposées par les barrières cérébrales et d'accroître l'exposition cérébrale locale aux molécules thérapeutiques. Les résultats observés restent variables en fonction de plusieurs paramètres et souvent mitigés. L'application qui semble être la plus envisageable est celle de la prise en charge des tumeurs cérébrales. Ces approches restent néanmoins très invasives, nécessitant une prise en charge spécialisée et sont associées à des risques importants de complications infectieuses et neurologiques. De plus, leur utilisation reste limitée dans les affections chroniques nécessitant une administration répétée ou prolongée.

# CHAPITRE 4 : LA VOIE NASALE : UNE APPROCHE PROMETTEUSE POUR CONTOURNER LA BHE

La voie nasale est une méthode d'administration fréquemment utilisée pour l'action locale des médicaments, par exemple dans le traitement des affections respiratoires, notamment pour la décongestion nasale. Elle est également utilisée comme alternative à l'administration systémique en raison de sa rapidité d'action et de sa capacité à contourner le premier passage hépatique pour les molécules métabolisées dans le tube digestif ou le foie. Plus récemment, elle a suscité un intérêt croissant dans le domaine de la vaccination.

Au-delà de ces applications classiques, la voie nasale est de plus en plus explorée pour le traitement des troubles du SNC en raison de ses connexions anatomiques directes avec le cerveau via les terminaisons nerveuses olfactives et trijumeaux. Elle représente l'approche la moins invasive parmi les stratégies permettant de contourner la BHE décrite dans la section précédente. Plus de 1 500 articles dans la base de données PubMed sont associés aux mots-clés « nose-to-brain delivery », montrant l'intérêt croissant de plusieurs équipes de recherche pour cette stratégie d'administration cérébrale entre 1974 et 2026.

Toutefois, à ce jour, aucun médicament n'a été approuvé par la FDA spécifiquement pour une administration par voie nasale, c'est-à-dire dans une indication où la BHE constitue le principal obstacle à la biodisponibilité intracérébrale du médicament. L'efficacité thérapeutique de plusieurs médicaments administrés par voie nasale et approuvés pour les pathologies neurologiques pourrait être aussi associée à leur absorption systémique. Par exemple, les formulations intranasales NAYZILAM®et VALTOCO®, indiquées dans le traitement de l'épilepsie, contiennent des benzodiazépines, petites molécules lipophiles de faible poids moléculaire (< 400 Da) capables de franchir facilement la BHE après leur passage dans la circulation sanguine. Dans ce contexte, la BHE ne constitue pas un obstacle majeur à leur distribution cérébrale. Ainsi, dans cette situation, il est difficile d'attribuer leur efficacité thérapeutique principalement à une voie d'absorption directe « nez-cerveau », compte tenu de la coexistence d'une absorption systémique classique, qui permet également l'accès au cerveau après le franchissement de la BHE.

Afin de mieux comprendre les défis associés à cette stratégie étudiée depuis plus de cinquante ans sans qu'aucun médicament spécifiquement développé pour la délivrance directe du nez au cerveau n'ait encore été approuvé, il est nécessaire de comprendre l'anatomie des voies nasales humaines ainsi que les principales limitations physiologiques et biopharmaceutiques liées à son utilisation.

# A. ANATOMIE DE L'INTERFACE « *NOSE TO BRAIN* »

La cavité nasale humaine possède une surface totale d'environ 160 $cm^2$, pouvant atteindre près de 96 000 $cm^2$ en incluant les microvillosités, pour un volume moyen d'environ 15 ml [152]. Elle est tapissée d'une muqueuse spécialisée, classiquement subdivisée en trois régions : la région vestibulaire, la région respiratoire et la région olfactive (figure 14).

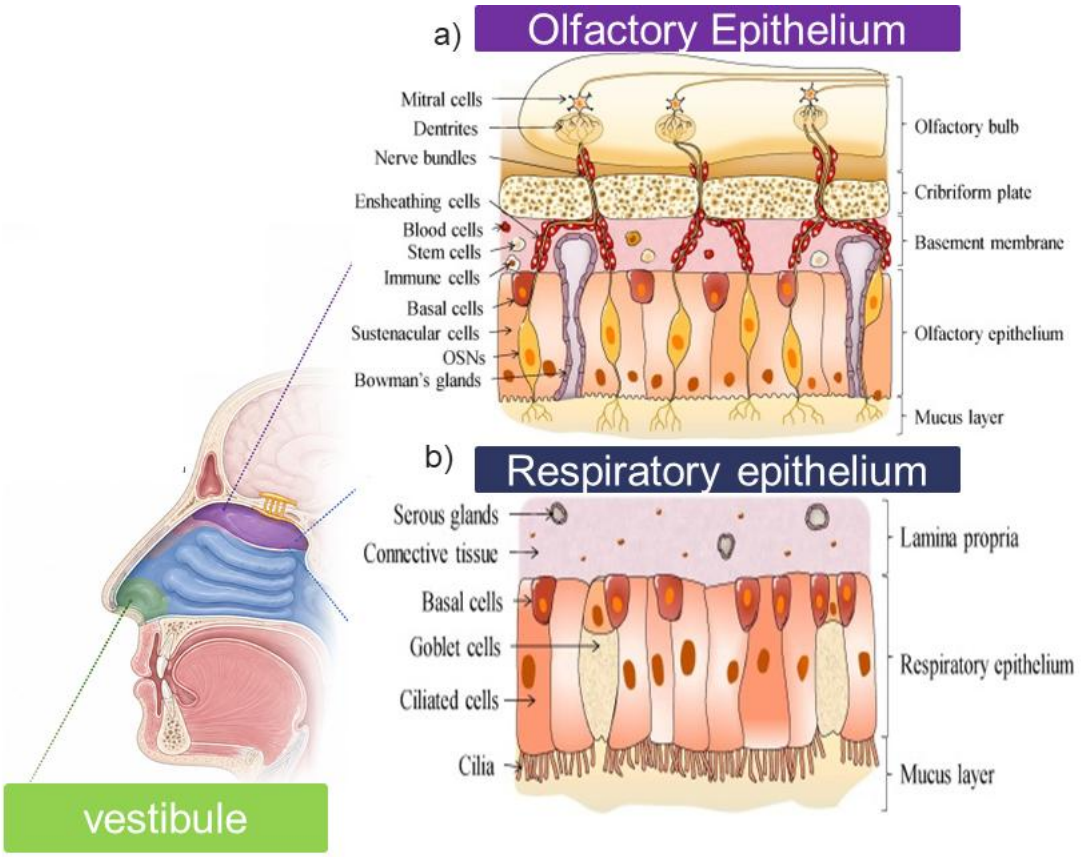



**Figure 14: Anatomie de la cavité nasale humaine. Epithéliums de la cavité nasale.** (a) Composition de l'épithélium olfactif situé sur le toit de la cavité nasale, qui contient principalement les neurones récepteurs ciliés, les cellules basales et les cellules susténaculaires, (b) Composition de l'épithélium respiratoire, qui tapisse les voies respiratoires supérieures et est principalement composé de cellules caliciformes, basales et ciliées. (Inspirée de Bourganis et al. 2018 [153]).

## A.1 La région vestibulaire

Située à l'entrée des narines, la région vestibulaire est la plus petite de la cavité nasale, avec une surface estimée entre 0,3 et 0,6 $cm^2$ [152,154]. Sa surface est recouverte de cils et d'une couche de mucus qui la protège des agents pathogènes et des particules extérieures [152].

## A.2 La région respiratoire

La région respiratoire constitue la plus grande partie de la cavité nasale, couvrant environ 103 $cm^2$. Elle est tapissée d'un épithélium respiratoire cylindrique pseudostratifié cilié, principal épithélium de la cavité nasale, contenant de nombreuses cellules caliciformes productrices de mucus [152]. Cette région est principalement composée de quatre types cellulaires : des cellules cylindriques ciliées et non ciliées, des cellules caliciformes sécrétrices de mucus et des cellules basales [152]. Les cellules ciliées possèdent de nombreuses microvillosités et environ 300 cils mobiles par cellule [154,155].

La région respiratoire joue un rôle majeur dans la protection des voies aériennes grâce au mécanisme de clairance mucociliaire. Elle participe également à l'humidification et au réchauffement de l'air inhalé. Le **mucus nasal**, composé majoritairement d'eau (à environ 95 %), et de 2 % de mucines, de 1 % sels et 1 % de protéines (dont des immunoglobulines et du lysozyme), est organisé en deux couches : une couche superficielle visqueuse (la « *gel layer*») déplacée par les cils, reposant sur une couche plus fluide (la « *sol layer*») qui permet le mouvement ciliaire [154,156]. **La clairance mucociliaire** est un mécanisme de défense physiologique au cours duquel les cils battent de façon coordonnée à une fréquence d'environ 1 000 battements/minute [156]. Ce mouvement permet le transport du mucus et des particules piégées vers le nasopharynx à une vitesse moyenne d'environ 5 mm/min. La couche muqueuse est ainsi entièrement renouvelée toutes les 15 à 20 minutes. Ce mécanisme constitue l'un des principaux obstacles à la rétention et à l'absorption des médicaments administrés par voie intranasale [154]. La région respiratoire est principalement innervée par les branches du nerf trijumeau, notamment les branches ophtalmique, maxillaire et mandibulaire, ainsi que par certaines branches du nerf facial [153].

## A.3 La région olfactive

La région olfactive se situe dans la partie supérieure de la cavité nasale, au niveau du toit du méat dorsal, et est recouverte par l'épithélium olfactif. Sa surface est d'environ 2,5 $cm^2$ par cavité nasale, soit environ 5 $cm^2$ au total, ce qui ne représente que 3 à 10 % de la surface totale de la cavité nasale entière [152,154,155]. En tenant compte des microvillosités, cette surface peut atteindre environ 3 000 $cm^2$. Au-dessus de cette région se trouve la lame criblée de l'ethmoïde, une structure osseuse horizontale séparant la cavité nasale de la cavité crânienne. Cette lame est perforée d'une vingtaine de foramens de chaque côté, permettant le passage des terminaisons nerveuses olfactives entre la cavité nasale et le bulbe olfactif [152].

L'épithélium est pseudostratifié cylindrique et recouvert de mucus. Il mesure environ 60 µm d'épaisseur et se compose de quatre types cellulaires principaux : les cellules sustentaculaires ou cellules de soutien, les cellules olfactives, les cellules à brosse et les cellules basales. Contrairement à l'épithélium respiratoire, il ne contient pas de cellules caliciformes, mais il possède des glandes de Bowman dont les sécrétions contribuent au nettoyage des structures sensorielles [152,154]. Les cils de cette région sont immobiles, contrairement à ceux de la région respiratoire [154]. Les cellules olfactives sont des neurones bipolaires dont les cils apicaux détectent les stimuli chimiques présents dans le mucus nasal et les convertissent en signaux nerveux [155]. **Leurs axones, d'environ 0,2 µm** de diamètre moyen, se regroupent en faisceaux appelés filaments olfactifs, qui traversent la lame criblée de l'ethmoïde pour atteindre directement le bulbe olfactif cérébral [152,154]. Ce trajet axonal continu de la cavité nasale au cerveau constitue la base anatomique de la voie nez-cerveau *(« nose to brain »* N2B) exploitée pour la délivrance de molécules thérapeutique dans cette approche. En dessous de l'épithélium, olfactif on retrouve une sous-muqueuse très vascularisée contenant des vaisseaux lymphatiques, les faisceaux d'axones olfactifs et des branches du nerf trijumeau, notamment la branche maxillaire [154–156].

## A.4 Jonctions cellulaires

Dans l'ensemble, les cellules épithéliales de la cavité nasale sont maintenues par quatre types de jonctions cellulaires [157] : les jonctions serrées de type *« tight junctions/zona occludens*) », qui fusionnent quasi-totalement les membranes adjacentes via la protéine occludine et constituent la principale barrière paracellulaire aux molécules ; les jonctions adhérentes et les desmosomes, qui assurent la cohésion mécanique du tissu via des glycoprotéines calcium-dépendantes (cadhérines, desmogléines) ancrées au cytosquelette ; et les jonctions gap, qui permettent au contraire la communication intercellulaire directe de petites molécules et d'ions via des canaux protéiques (connexons). Les jonctions serrées représentent l'obstacle majeur au transport paracellulaire des molécules thérapeutiques, notamment des macromolécules, vers le cerveau dans le cadre de la stratégie de délivrance Nasale N2B.

## A.5 Contraintes anatomiques de la voie « *nose-to-brain* »

Comme mentionné en introduction, la stratégie « nose-to-brain» N2B est étudiée depuis plus de cinquante ans. Pourtant, aucun médicament spécifiquement développé pour cette voie d'administration n'a encore été approuvé par la FDA ou l'EMA. Parmi les différentes causes possibles, l'une des plus importantes pourrait être les modèles précliniques utilisés. En effet, l'anatomie de la cavité nasale diffère considérablement

d'une espèce à l'autre. L'épithélium olfactif en est un exemple qui d'ailleurs reflète les différences de capacités sensorielles et olfactives entre l'homme et l'animal [156]. Chez l'homme, l'épithélium olfactif ne représente que 3 à 5 % de la surface totale de la cavité nasale, alors qu'il occupe près de 50 % chez le rat et peut atteindre environ 100 à 150 $cm^2$ chez le chien [105,106].

Ces différences anatomiques rendent difficile la transposition des résultats précliniques à l'homme. Pour améliorer l'extrapolation clinique de cette approche, plusieurs solutions sont en cours de développement, notamment des modèles de cellules humaines, des organoïdes nasaux, des modèles de cavité nasale imprimés en 3D et des dispositifs permettant un ciblage plus efficace de la région olfactive humaine.

# B. LES VOIES D'ACHEMINEMENTS DES MOLECULES BIOPHARMACEUTIQUES DU NEZ VERS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

La stratégie N2B repose principalement sur les connexions nerveuses entre la cavité nasale, le cerveau et la moelle épinière pour permettre la délivrance directe de médicaments au SNC, en contournant partiellement la BHE. Cependant, malgré de nombreuses études sur cette approche, les mécanismes exacts impliqués restent mal compris [154,156]. Plusieurs voies de transport directes et indirectes ont été proposées dans la littérature. Selon ces études, le transport de molécules de la cavité nasale vers le SNC peut impliquer le système vasculaire, le LCR et le système lymphatique. Trois voies principales sont généralement décrites : (1) la voie systémique, (2) la voie olfactive et (3) la voie trigéminale [154,156,159]. Ces différentes voies ne présentent ni les mêmes sites d'absorption ni les mêmes vitesses de transport vers le cerveau. Elles peuvent être impliquées simultanément dans le passage des molécules vers le SNC. Cependant, l'une d'entre elles peut prédominer en fonction des propriétés physico-chimiques de la molécule, de sa formulation ou du mode d'administration utilisé [154,156]. Le transport de médicaments par voie neuronale semble être la voie la plus pertinente pour atteindre le SNC.

Les principales voies de transport sont illustrées dans la figure 15.

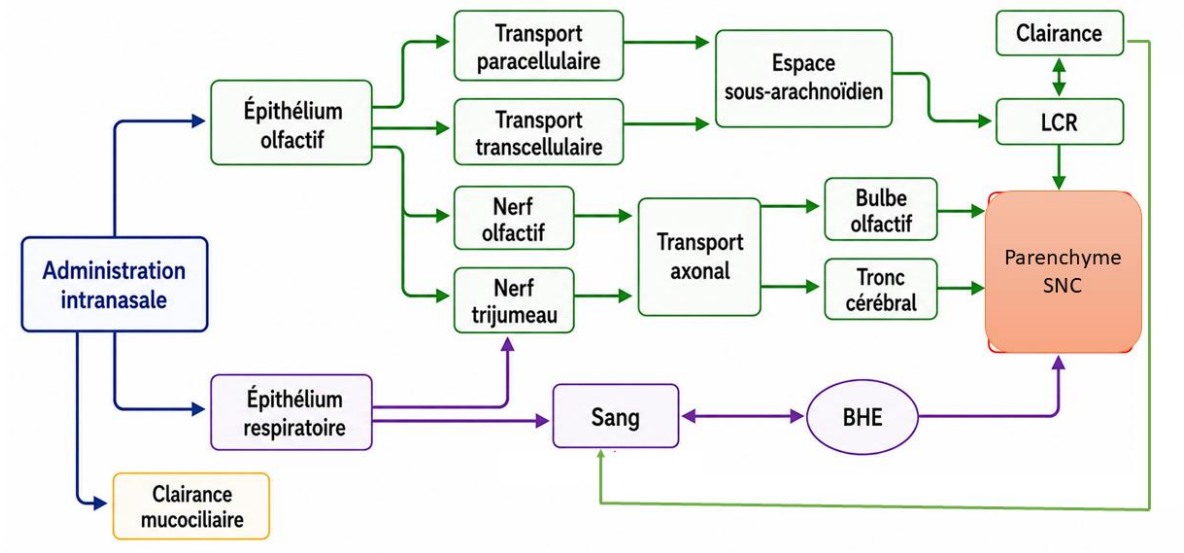



**Figure 15: Principales voies de transport vers le SNC après administration intranasale.** (Inspirée de Selvaraj et al. 2018 [159]).

## B.1 La voie olfactive

Sur le plan anatomique, le nerf olfactif établit une connexion directe entre la cavité nasale et le cerveau. L'espace périneuronal qui entoure les nerfs crâniens communique avec l'espace sous-arachnoïdien et par conséquent, avec le LCR. Il existe également un drainage du LCR le long des nerfs crâniens vers l'épithélium nasal. La fraction de molécules passée dans le LCR sera alors face à la même problématique que l'injection intra LCR discuté dans la section précédente. Pour qu'une molécule active passe de la région olfactive nasale au LCR ou au parenchyme cérébral, il doit traverser l'épithélium olfactif et, selon le trajet emprunté, la membrane arachnoïdienne délimitant l'espace sous-arachnoïdien [154]. Trois voies principales ont été décrites pour le passage à travers l'épithélium olfactif :

- Le passage transcellulaire implique principalement les cellules sustentaculaires. Le transport peut s'effectuer par endocytose médiée par un récepteur, endocytose en phase liquide ou diffusion passive. Ce mécanisme de passage est plus important pour les molécules lipophiles, la vitesse de diffusion dépendant du degré de lipophilie [154].
- Le passage paracellulaire implique le passage à travers les jonctions serrées entre les cellules sustentaculaires ou entre les cellules sustentaculaires et les neurones olfactifs. Cette voie concerne principalement les molécules hydrophiles diffusant à travers les pores aqueux. Il s'agit d'un mécanisme passif et relativement lent, fortement dépendant du poids moléculaire. Sans ajout de promoteurs d'absorption, les molécules de poids moléculaire inférieur à 1 000 Da présentent généralement une bonne biodisponibilité nasale. Avec certains promoteurs d'absorption, cette limite peut atteindre environ 6 000 Da [154].
- La voie neuronale olfactive, dans laquelle le médicament est internalisé par les neurones olfactifs via endocytose ou pinocytose, puis transporté le long des axones par transport axonal intracellulaire jusqu'au bulbe olfactif, avant d'être redistribué dans tout le SNC [154,156]. La molécule peut se déplacer le long du nerf dans des vésicules endocytiques. Une fois dans le cerveau, elle est exocytée et peut être redistribuée dans tout le SNC [160].

Pour distinguer cette dernière voie des deux précédentes, certains auteurs classent les mécanismes de transport en voies intraneuronales et extraneuronales. La voie intraneuronale repose sur le transport axonal et nécessite généralement plusieurs heures, voire plusieurs jours, pour atteindre différentes régions cérébrales. À l'inverse, la voie extraneuronale utilise les espaces périneuronaux et permet un accès beaucoup plus rapide au cerveau, parfois en quelques minutes seulement [159].

Les axones olfactifs humains ont un diamètre compris entre 0,1 et 0,7 µm ; par conséquent, seules les entités compatibles avec ces dimensions pourraient potentiellement être transportées par cette voie [156]. Bien que de nombreuses études aient documenté le transport axonal de molécules libres ou encapsulées dans des

nanoparticules, on constate dans l'ensemble que : ce mécanisme est lent et peu efficace, nécessitant un temps considérable pour que le principe actif atteigne le SNC. Cependant, des vitesses de transport plus rapides sont également rapportées dans la littérature, suggérant que ces cinétiques peuvent être modulées par plusieurs facteurs, notamment la nature de la substance transportée, l'espèce animale et le diamètre de l'axone [156]. Les différents mécanismes de transport à travers l'épithélium olfactif peuvent ainsi être résumés en cinq modalités : diffusion passive transcellulaire, diffusion passive paracellulaire, transport médié par transporteur, transcytose et ainsi que divers phénomènes de convection et de diffusion extracellulaire dans les espaces périneuronaux, périvasculaires ou lymphatiques [154,156].

## B.2 La voie trigéminale

Bien que la voie olfactive soit la plus fréquemment décrite dans l'approche N2B, la voie trigéminale suscite actuellement un intérêt croissant pour l'administration intranasale de médicaments au SNC. Le nerf trijumeau est le plus volumineux des nerfs crâniens. Par ses différentes branches, le nerf trijumeau innerve indirectement les épithéliums respiratoires et olfactifs. Ses branches ophtalmiques, maxillaires et mandibulaires participent à l'innervation de la muqueuse nasale, notamment dans les régions antérieures, dorsales et latérales [156]. Elle établit une connexion anatomique avec le bulbe rachidien, le tronc cérébral et certaines régions de la moelle épinière [159]. Plusieurs études ont montré que cette voie peut transporter des molécules ou des formulations vers le tronc cérébral et les structures associées, notamment par transport axonal. Thorne et al. ont par exemple montré pour la première fois que l'administration intranasale d'IGF-I (analogue de l'insuline) radiomarqué à l'Iode 125 permettait une distribution rapide au cerveau via la voie trijumeau marquée par une radioactivité importante dans les branches du nerf trijumeau [161]. Comme pour la voie olfactive, plusieurs mécanismes de transport semblent être impliqués : des mécanismes intraneuronaux via le transport axonal, mais aussi des mécanismes extraneuronaux impliquant le transport transcellulaire (RMT, AMT, transporteurs membranaires) ou paracellulaire [156,159].

## B.3 La voie systémique

L'approche N2B est initialement décrite comme une stratégie non invasive qui contourne la BHE, contrairement aux voies d'administration conventionnelles telles que l'administration intraveineuse (IV) ou intra-artérielle (IA). Son principal objectif est de faciliter l'administration directe et rapide des médicaments au SNC. Cependant cette capacité ne s'applique pas pour toutes les molécules, et de façon uniforme en fonction des voies de transports qu'elles vont empruntées. En effet, d'un point de vue anatomique, l'épithélium respiratoire, sur lequel se dépose une fraction importante du

médicament administré, est fortement vascularisé et présente une capacité d'absorption systémique supérieure à celle de l'épithélium olfactif [162]. Cette fraction semble quelques fois supérieure à celle qui passe dans le cerveau [163]. Une partie du principe actif pénètre ainsi dans la circulation sanguine générale, ce qui nous ramène à la problématique centrale du franchissement de la BHE, avec toutes les contraintes déjà abordées dans les sections précédentes.

La voie systémique concerne principalement les molécules ou formulations transportées par voie transcellulaire et paracellulaire, via la voie extraneuronale. Les molécules qui atteignent ensuite le cerveau par cette voie indirecte doivent donc pouvoir traverser la BHE de manière secondaire. Ainsi, bien que les mécanismes régissant le transport à travers l'épithélium nasal que sont la diffusion paracellulaire et transcellulaire, soient également limités aux petites molécules lipophiles, et que des mécanismes de transcytose spécifiques et non spécifiques y soient également retrouvés, comme ceux décrits au niveau de la BHE, il est important de souligner que l'épithélium nasal reste globalement plus perméable que la BHE. Il est également important de préciser qu'il existe une différence d'un point de vue perméabilité au sein des deux régions épithéliales de la cavité nasale [164]. La région respiratoire possède un épithélium continu et fenêtré, permettant le passage des petites molécules et des macromolécules dans la circulation systémique [159].

De plus, l'utilisation de promoteur d'absorption pourrait accroître la perméabilité de cet épithélium et amplifier le passage systémique, renforçant ainsi cette limitation. Dans ce contexte, la voie systémique s'avère particulièrement restrictive pour les macromolécules hydrophiles, dont le transport reste dépendant pour certains de mécanismes physiologiques spécifiques pour atteindre le parenchyme cérébral. En l'absence de ces mécanismes, l'accès à la circulation systémique ou au LCR n'est pas un indicateur fiable de la biodisponibilité cérébrale d'une molécule. Cette difficulté est particulièrement pertinente pour ce projet, qui porte sur l'administration intranasale d'IgG. La voie systémique représente ainsi une voie de distribution indirecte et potentiellement inefficace vers le parenchyme cérébral pour ce type de macromolécule, soulignant la nécessité de trouver des solutions dans le développement des formulations destinées à cette approche N2B.

# C. CONSIDERATIONS PHARMACOCINETIQUES DE LA DELIVRANCE N2B : FACTEURS D'EFFICACITE ET LIMITATIONS

## C.1 les propriétés physicochimiques de la molécule

Comme décrit dans la section relative aux voies de passage, la perméabilité de l'épithélium nasal est principalement déterminée par les propriétés physico-chimiques de la molécule, notamment sa masse moléculaire, son caractère lipophile ou hydrophile exprimé par le coefficient de partage octanol/eau (log P), et son degré d'ionisation (pKa), son KD et d'autres paramètres. Comme la plupart des autres membranes biologiques, la muqueuse nasale est plus favorable au passage des molécules lipophiles que hydrophile [165].

De manière générale, la perméabilité épithéliale est inversement proportionnelle à la taille moléculaire. Bien qu'il soit communément admis que les molécules de masse moléculaire supérieure à 1 000 Da présentent une faible perméabilité aux barrières physiologiques, des études chez le rat ont démontré que des molécules allant jusqu'à 20 000 Da peuvent être transportées directement de la cavité nasale au LCR, avec des concentrations plasmatiques inférieures à celles obtenues après administration intraveineuse [166]. Ces observations révèlent l'existence d'un transport direct préférentiel, indépendant de la voie systémique. Le passage des macromolécules encore plus grandes a été démontré pour les peptides, les protéines et même les virus. Plusieurs études réalisées sur des modèles *in vitro* et *in vivo* ont démontré le passage des IgG dans le SNC par voie intranasale, avec une biodisponibilité cérébrale supérieure à celle obtenue par voie intraveineuse [167–170]. Ce transport a été attribué à un mécanisme de transcytose impliquant le récepteur Fc néonatal (FcRn), qui reconnaît spécifiquement la région Fc des IgG et facilite leur passage à travers l'épithélium. Pour d'autres classes de macromolécules, les voies intraneuronales et en particulier le transport axonal des neurones olfactifs semble être le principal mécanisme de transport vers le SNC. De plus, certains virus, malgré leur taille plus importante, peuvent également atteindre le bulbe olfactif via les voies de transport axonales neuronales [171].

## C.2 Concentration, dose et volume d'administration

La concentration, le dosage et le volume d'administration sont des paramètres interdépendants qui influencent directement l'efficacité de l'absorption nasale. Lorsque

le transport s'effectue par diffusion passive, l'absorption est proportionnelle à la concentration de la molécule, en suivant son gradient de concentration, dans les limites physiologiques de la muqueuse. Ainsi, bien que l'absorption augmente avec la dose administrée, elle est essentiellement limitée par le volume restreint de la cavité nasale [165]. Chez l'homme, le volume administrable dans la cavité nasale est compris entre 25 et 200 µL, ce qui limite considérablement la dose totale pouvant être administrée. Cette contrainte est particulièrement critique pour les molécules thérapeutiques peu solubles ou instables à fortes concentrations, telles que les protéines et les anticorps monoclonaux, dont la formulation à forte concentration peut induire une agrégation ou une dénaturation [165]. De plus, le seuil de volume au-delà duquel apparaissent des effets indésirables locaux reste un sujet controversé dans la littérature. Plusieurs études ont révélé qu'un volume supérieur à 1 % du volume total de la cavité nasale (environ 200 µL en moyenne chez l'homme, 4 µL chez le rat et 0,3 µL chez la souris) est susceptible d'induire des lésions de la muqueuse nasale [148]. Chez l'humain, l'instillation de plus de 100 µL/narine cause les lésions locales, et le volume préférentiel est de 25µL soit moins de 1% du volume de la cavité nasale estimé à 20 ml [148]. Ce paramètre est particulièrement important pour l'interprétation des études précliniques d'administration de N2B. En effet, de nombreuses études réalisées sur des modèles rongeurs ont administré des volumes dépassant ce seuil de 1 % (6 à 15%), générant des lésions épithéliales qui augmentent artificiellement la perméabilité de la muqueuse et conduisent à des conclusions sur l'efficacité de l'administration de N2B non applicables à l'homme [99]. Ces artefacts expérimentaux contribuent ainsi à surestimer le potentiel de la voie intranasale et expliquent en partie les échecs observés lors de la transposition clinique des résultats précliniques [148].

## C.3 Muscus nasal

Le mucus nasal, une couche de 5 à 15 µm tapissant l'ensemble de la cavité nasale, constitue la première barrière que tout médicament administré par voie intranasale doit franchir. Tout médicament administré par la voie nasale sous sa forme libre ou encapsulée doit d'abord traverser le mucus pour adhérer à l'épithélium avant d'être absorbé. Composé à 95 % d'eau, de mucines (2 %), de sels (1 %) et de protéines (1 %), il forme un réseau de fibres glycoprotéiques réticulées (mucines) dont la taille des mailles varie de 20 à 200 nm [154,160,172]. Leurs propriétés physico-chimiques (pH 5,5 à 6,5, taille des pores 150 ± 50 nm, viscosité 1,8 ± 1,7 Pa·s) régulent la perméabilité des molécules et des particules par exclusion stérique, interactions électrostatiques, interactions hydrophobes et liaisons hydrogène [172]. La taille est un paramètre essentiel, mais non déterminant. L'espace intermatriciel existant est suffisamment large pour ne pas impacter la diffusion des petites molécules et particules. Cette maille

constitue un frein pour les particules plus grosses qui sont ralenties dans ce réseau [160]. Des particules jusqu'à 500 nm peuvent pénétrer le mucus lorsque leurs interactions d'adhésion avec les fibres de mucine sont très faibles, ou par déformation mécanique [173]. Les particules ou les molécules thérapeutiques non chargées, qui n'interagissent pas avec le mucus, peuvent diffuser à travers celui-ci à une vitesse similaire à leur vitesse de diffusion dans l'eau [160]. Le caractère lipophile/hydrophile influence également car les molécules hydrophiles traversent le mucus plus facilement que les composés lipophiles car, les interactions électrostatiques, lipophiles et de Van der Waals existent avec le mucus [160]. Les variations de pH peuvent modifier la conformation des mucines en exposant leurs domaines hydrophobes et en perturbant les interactions, ce qui augmente la viscoélasticité du réseau et réduit davantage la diffusion des formulations [173]. De plus, les ions chargés positivement se lient aux mucines chargées négativement, mais cette interaction dépend du pH et est plus faible en présence d'ions de forte force ionique [160]. Ces paramètres doivent être pris en compte lors de la conception de médicaments destinés à l'administration intranasale.

## C.4 Clairance mucociliaire de la muqueuse nasale et forme pharmaceutique

L'épithélium nasal, tant respiratoire qu'olfactif, est un épithélium cilié recouvert de microvillosités, offrant une vaste surface d'échange propice à l'absorption des médicaments [165] . Il est recouvert d'une couche de mucus dont le rôle physiologique est de piéger les particules exogènes et les pathogènes qui sont ensuite éliminés de la cavité nasale par le battement coordonné des cils. Ce battement, stimulé par une signalisation biochimique, se produit à une fréquence de 12 à 15 Hz (environ 1000 battements par minute) et propulse le mucus, ainsi que les particules qu'il contient, vers le pharynx, puis l'œsophage et enfin le tube digestif, à une vitesse d'environ 5 mm/min [154,174,175]. Ce mécanisme de défense, appelé clairance mucociliaire, constitue l'une des principales limitations de la voie intranasale. Il réduit le temps de séjour des formulations dans la cavité nasale et, par conséquent, restreint la fenêtre d'absorption des molécules thérapeutiques. Les formulations conventionnelles (gouttes, sprays, aérosols) sont ainsi éliminées de la cavité nasale en 15 à 30 minutes, ce qui peut compromettre leur absorption et leur biodisponibilité [114,121]. De nombreux facteurs peuvent modifier cette clairance, notamment la viscosité de la formulation, la température, l'humidité, les agents chimiques, les infections et les pathologies nasales [174,175]. Par ailleurs, les formulations irritantes peuvent également stimuler par reflexe les sécrétions nasales, entraînant une dilution rapide du médicament ainsi qu'une élimination et une déglutition accélérées [174].

Pour faire face à la clairance mucociliaire et améliorer la biodisponibilité cérébrale, plusieurs stratégies ont été développées afin de prolonger le temps de résidence ou

contact de la formulation dans l'épithélium nasal. Sur le plan physico-chimique de la molécule et ou formulation, un pH de formulation compris entre 4,5 et 6,5 limite l'irritation de la muqueuse et augmente la perméabilité épithéliale. La taille et la charge des molécules jouent également un rôle crucial : les petites molécules non chargées pénètrent facilement la couche de mucus, tandis que les macromolécules ou les molécules chargées ont plus de difficultés à franchir cette barrière. Sur le plan galénique, le développement de formulations mucoadhésives est l'approche la plus étudiée. Les polymères mucoadhésifs, tels que le chitosane ont démontré leur capacité à accroître la bioadhésion des formulations à la muqueuse nasale, prolongeant ainsi leur temps de résidence et améliorant leur absorption. Diverses formes galéniques innovantes ont été développées pour l'administration intranasale, notamment les liposomes, les nanoémulsions, les microparticules et les nanoparticules polymériques. Ces systèmes améliorent l'absorption nasale par deux mécanismes principaux : en accélérant la diffusion à travers le mucus ou en prolongeant le temps de contact avec la muqueuse [165,175]. De plus, certaines de ces nanoparticules ont démontré leur capacité à atteindre le SNC par transport axonal le long du nerf olfactif, offrant ainsi une voie d'administration directe au cerveau [165].

## C.5 Barrière enzymatique de la muqueuse olfactive

Au-delà de la clairance mucociliaire, les principes actifs administrés par voie intranasale subissent une importante dégradation enzymatique dans la cavité nasale [106,114,121–123]. Ce système enzymatique est complexe et comprend les isoformes du cytochrome P450 (CYP1A, CYP2A, CYP2E), des enzymes oxydatives et de conjugaison, des carboxylestérases, des glutathion S-transférases, ainsi que des exo- et endopeptidases [156,165,176]. Cette activité enzymatique est répartie de manière inégale dans la cavité nasale. Chez plusieurs espèces, dont le chien, le macaque et le rat, la concentration de cytochrome P450 est six fois plus élevée dans la muqueuse olfactive que dans la muqueuse respiratoire [156]. De plus, l'activité du cytochrome P450 dans la région olfactive dépasse celle du foie, en raison d'une concentration de NADPH-cytochrome P450 réductase trois à quatre fois supérieure à celle mesurée dans le tissu hépatique [176].

Ces enzymes constituent ensemble une véritable barrière enzymatique nasale. Ce phénomène est désigné dans la littérature comme un pseudo-effet de premier passage nasal. Il est particulièrement préjudiciable aux macromolécules thérapeutiques (protéines, peptides et anticorps), qui sont les principales cibles de dégradation par ce système enzymatique. Les peptidases et protéases nasales, dont l'aminopeptidase est l'enzyme prédominante, limitent ainsi considérablement la biodisponibilité des formulations peptidiques et protéiques administrées par voie intranasale [156,176]. Plusieurs études ont quantifié cette dégradation enzymatique sur des molécules comme la vasopressine et l’insulines et ont montré une dégradation rapide dans la muqueuse nasale de lapin pour la vasopressine [177]. Concernant l'insuline, des taux

de dégradation inférieurs à 0,02 µg/min ont été mesurés dans des lavages nasaux humains [178]. Dans le cas des IgG, plusieurs études dont celle de Correa et al. 2023 rapporte l'administration intranasale réussie d'anticorps anti-Nogo-A au SNC, sans toutefois mentionner leur dégradation enzymatique nasale [169].

Pour contourner cette barrière enzymatique, diverses stratégies ont été proposées, notamment l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques, tels que l'amastatine ou les dérivés de l'acide aminoboronique, administrés comme excipients ou en co-traitement [156,174,176]. Des approches galéniques, incluant les systèmes de micro- et nanoparticules et l'optimisation du pH des formulations, ont également été développées pour améliorer la stabilité des molécules thérapeutiques dans la muqueuse nasale [156]. Certains tensioactifs, notamment les sels biliaires, peuvent améliorer l'absorption en inhibant partiellement les enzymes protéolytiques [176]. Ainsi, en plus des barrières de perméation épithéliales et la clairance mucociliaire, la dégradation enzymatique représente une troisième limitation majeure à l'administration N2B de macromolécules thérapeutiques, dont il faut prendre compte dans la conception des formulations intranasales.

## C.6 Accessibilité de la région olfactive et dispositifs d'administration

La localisation anatomique de l'épithélium olfactif dans la partie supérieure et profonde de la cavité nasale constitue un obstacle à son ciblage au cours de la délivrance intranasale. L'épithélium olfactif étant situé dans une zone d'accès limitée, les particules ou gouttelettes administrées doivent pénétrer suffisamment haut et profondément dans la cavité nasale pour être efficacement déposées [179]. Cependant, les dispositifs d'instillations nasales conventionnels sont peu adaptés à cet usage. Des études de modélisation réalisées par Xi et al. (2016) ont démontré que la majorité des gouttelettes d'un spray nasal conventionnel se déposent dans la partie antérieure de la cavité nasale et que moins de 4,6 % de la dose administrée atteint effectivement la région olfactive [179]. Pour pallier cette limitation, des dispositifs médicaux spécifiques ont été conçus pour cibler la région olfactive. Ces dispositifs, permettent une instillation dirigée vers la partie supérieure de la cavité nasale, optimisant ainsi la distribution de la formulation au contact de l'épithélium olfactif [179,180]. Parmi les dispositifs développés, le dispositif OptiNose™ est actuellement disponible sur le marché pour cibler la région olfactive. Il repose sur la technologie bidirectionnelle, activée par l'expiration du patient, qui ferme automatiquement le voile du palais et isole la cavité nasale, permettant ainsi la diffusion de la formulation vers les régions postérieures supérieures de la cavité nasale. Une étude clinique a démontré que le système OptiNose® atteignait les régions postérieures supérieures des fosses nasales avec 53,6 % de la dose administrée, contre seulement 15,7 % avec un spray liquide classique, sans aucun dépôt pulmonaire [181] .

## C.7 Position d'administration

La position du patient ou de l'animal lors de l'administration est un paramètre pharmacocinétique à prendre en compte. Plusieurs études précliniques ont établi une corrélation significative entre l'angle d'inclinaison de la tête ou du corps et les concentrations du médicament dans le LCR. Par exemple, chez le rat, la position couchée sur le dos à 90° a doublé l'absorption du médicament dans le LCR par rapport à la position debout [165]. La position couchée pourrait favoriser l'accumulation du médicament dans la partie supérieure de la région olfactive, prolongeant le contact avec l'épithélium et augmentant ainsi la probabilité d'absorption cérébrale [165].

## C.8 Impact de l'anesthésie dans les études précliniques

Dans les études précliniques utilisant des modèles animaux, les animaux sont le plus souvent anesthésiés (par inhalation ou injection) lors de l'administration intranasale. Ce paramètre pourrait impacter les résultats car, il peut influencer significativement la capacité et la vitesse d'absorption nasale [165]. En effet l'anesthésie peut influencer l'absorption nasale en prolongeant le temps de contact entre la formulation et l'épithélium muqueux, en réduisant les mouvements réflexes de l'animal et en augmentant potentiellement la perméabilité de l'épithélium olfactif [182]. Cependant, des effets contraires ont également été rapportés [165]. Par exemple, l'inhalation d'halothane peut diminuer la contractilité myocardique et le débit cardiaque tout en augmentant la fréquence respiratoire, ce qui pourrait accélérer la clairance mucociliaire et ainsi réduire l'absorption nasale du médicament [165].

En résumé, l'absorption et la perméabilité des médicaments administrés par la voie nasale sont influencées par un ensemble de facteurs pharmacocinétiques interdépendants, dont les principaux ont été regroupés dans la figure 16 ci-dessous.

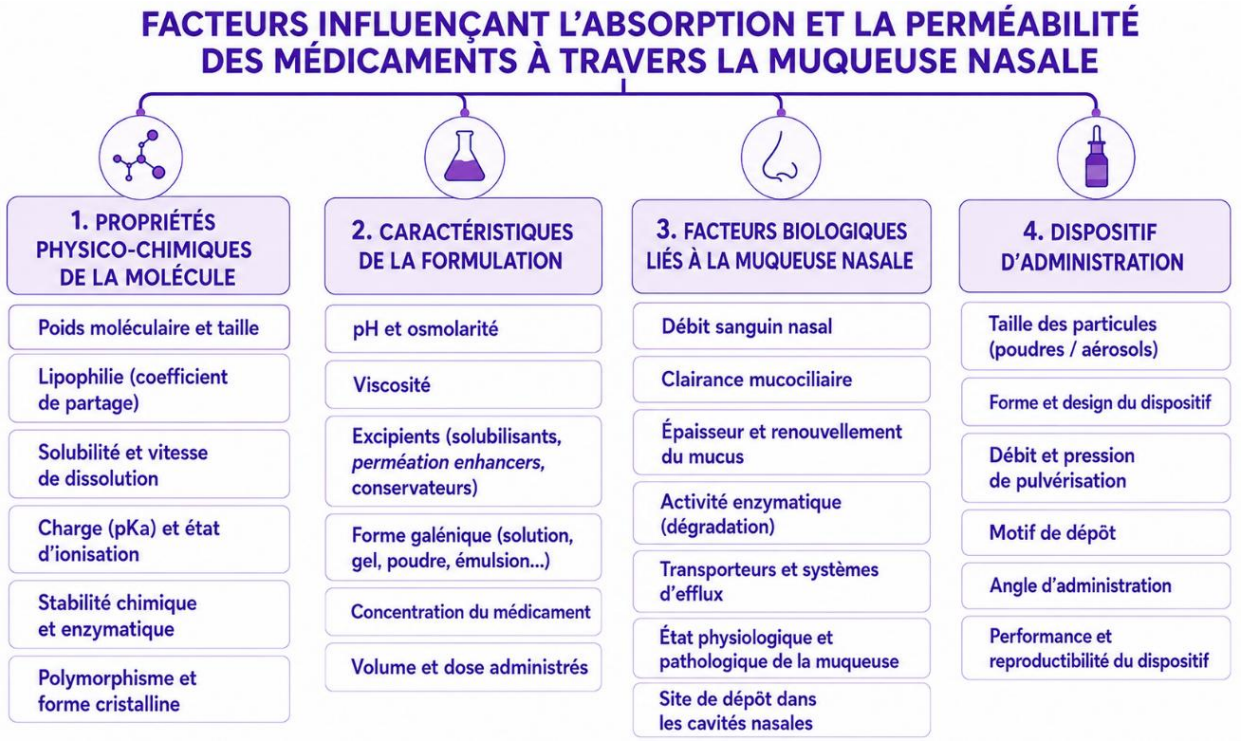



**Figure 16: Facteurs influençant l'absorption et la perméabilité des médicaments à travers la muqueuse nasale.** L'absorption nasale est déterminée par quatre paramètres interdépendants : les propriétés physico-chimiques de la molécule thérapeutique, les caractéristiques de la formulation, les facteurs biologiques spécifiques à la muqueuse nasale et le dispositif d'administration. L'optimisation de ces paramètres est essentielle au développement de systèmes d'administration nasale efficaces. (inspiré de Pardeshi, 2013 [154]).

# D. AVANTAGES ET LIMITATIONS DE L'APPROCHE N2B

Les avantages et les limitations de l'administration intranasale, discutés dans les sections précédentes, sont synthétisés dans les tableaux 4 et 5 ci-dessous.

**Tableau 4: avantages de la voie nasale**

| Catégorie | Avantages de la voie nasale |
|---|---|
| **Profil d'administration** | Non invasive, rapide et sûre |
| | Simple et donc meilleure observance thérapeutique |
| **Pharmacocinétique** | Contourne le premier passage hépatique : biodisponibilité systémique accrue |
| | Évite la dégradation gastro-intestinale |
| | Absorption rapide, début d'action quasi-immédiat |
| | Excellente biodisponibilité : pour les molécules de faible masse molaire |
| **Ciblage du SNC** | Contourne la BHE : délivrance directe et ciblée au SNC, réduction des effets secondaires systémiques |
| | Alternative à la voie conventionnelle parentérale : pour peptides, protéines, anticorps (IgG via FcRn) et cellules souches |
| | Transport axonal des nanoparticules : vers le bulbe olfactif via les neurones olfactifs et trijumeau |

**Tableau 5 : limitations de la voie nasale**

| Catégorie | Limitations de la voie nasale |
|---|---|
| **Contraintes anatomiques** | Volume administrable très limité : 25–200 µL/narine chez l'homme ; dose totale restreinte |
| | Épithélium olfactif difficile d'accès : < 4,6 % de la dose atteint la région olfactive avec un spray classique |
| | Dépôt majoritaire en région antérieure : épithélium respiratoire, faible contact avec l'épithélium olfactif postéro-supérieur |
| **Barrières physiologiques** | Clairance mucociliaire rapide : élimination des formulations en 15–30 min ; fenêtre d'absorption réduite |
| | Mucus : barrière physico-chimique : exclusion stérique (mailles 20–200 nm), interactions électrostatiques et hydrophobes |
| | Dégradation enzymatique locale : CYP450, peptidases « pseudo-premier passage nasal » |

| | |
|---|---|
| | Perméabilité réduite pour les macromolécules |
| | Forte variabilité inter-individuelle : congestion nasale, pathologies, état physiologique de la muqueuse |
| **Biais expérimentaux précliniques** | Volumes administrés excessifs chez le rongeur : souvent 6–15 % du volume nasal (seuil : 1 %) → lésions artificielles et surestimation de l'absorption |
| | Effets de l'anesthésie : modification de la perméabilité et de la clairance mucociliaire selon le protocole |
| | Mécanismes N2B partiellement élucidés : données précliniques difficilement transposables à l'homme |

# E. STRATEGIES AMELIORANT LA DELIVRANCE DE MOLECULES ACTIVES PAR VOIE NASALE

Comme mentionné précédemment, la voie intranasale présente plusieurs limitations susceptibles de restreindre la biodisponibilité cérébrale des médicaments administrés par cette voie. Parmi les principaux obstacles figurent l'activité enzymatique élevée de la muqueuse nasale, la clairance mucociliaire rapide, la faible perméabilité de l'épithélium nasal à certaines molécules et les difficultés de dépôt et de rétention des formulations dues à la complexité anatomique de la cavité nasale. Pour pallier ces contraintes, de nombreuses stratégies, conventionnelles et innovantes, ont été développées afin d'améliorer la délivrance cérébrale de médicaments par voie nasale. Ces approches visent à accroître le ciblage cérébral, à améliorer la perméabilité épithéliale, à prolonger le temps de séjour dans la cavité nasale et à renforcer la stabilité des molécules thérapeutiques. Elles reposent soit sur la modification des propriétés physico-chimiques des molécules, soit sur des approches galéniques intégrant des excipients tels que des promoteurs d'absorption ou des inhibiteurs enzymatiques, ainsi que sur l'utilisation de systèmes de vectorisation par micro- et nanoparticules issues des nanotechnologies.

## E.1 Modification chimique ou structurale des agents thérapeutiques

Les modifications chimiques ou structurales constituent une première approche pour optimiser la vitesse et l'efficacité de l'absorption cérébrale des principes actifs administrés par voie intranasale. Bien que le poids moléculaire et la lipophilie soient les paramètres les plus fréquemment cités comme déterminants de la perméabilité nasale, les stratégies de modification chimique peuvent améliorer la stabilité du principe actif au sein de l'épithélium nasal ou augmenter sa perméabilité. Plusieurs approches ont été décrites dans la littérature.

La synthèse de prodrogues, la plus repandue, permet de masquer les groupements fonctionnels responsables de l'instabilité ou de l'insolubilité. La PEGylation et la lipidation permettent de moduler l'équilibre hydrophile/lipophile de la molécule afin d'optimiser son interaction avec les membranes épithéliales. La substitution d'acides aminés peut être utilisée pour réduire la reconnaissance de la molécule par les enzymes protéolytiques de la muqueuse nasale, limitant ainsi sa dégradation au site d'absorption [156,165]. Enfin, la fonctionnalisation de la molécule par des ligands spécifiques permet un ciblage actif des récepteurs exprimés à la surface de l'épithélium nasal.

Dans le cas spécifique des IgG, bien que le mécanisme ne soit pas encore totalement élucidé, le récepteur Fc néonatal (FcRn) a été identifié comme potentiellement impliqué dans leur transport à travers l'épithélium nasal [167]. Des modifications structurales ont donc été explorées afin d'optimiser leur passage par cette voie. En particulier, la déglycosylation des IgG a montré des résultats prometteurs : Simone Ladel et al. (2020) ont rapporté qu'une IgG déglycosylée présentait une perméation significativement plus élevée que l'IgG native dans des modèles *in vitro* de cellules épithéliales olfactives primaires RPMI2650 [167]. Toutefois, il faut noter que ces approches de modifications chimiques sont difficiles à mettre en œuvre pour certaines familles de molécules thérapeutiques, notamment les protéines comme les anticorps monoclonaux. En effet, la modification structurale peut altérer leur conformation et, par conséquent, compromettre leur fonctionnalité. Cette contrainte constitue une limitation majeure de cette approche pour les biothérapies, justifiant le recours à des stratégies galéniques complémentaires.

## E.2 Approche galénique

### E.2.1 Ajout d'adjuvants de formulation : promoteurs d'absorption, inhibiteurs enzymatiques

Plusieurs adjuvants peuvent être incorporés aux formulations intranasales pour agir à différents niveaux de la cascade d'absorption nasale. Ces additifs comprennent des agents simples, tels que des sels et des tampons utilisés pour ajuster le pH, la solubilité ou moduler le point isoélectrique des protéines, ainsi que d'autres agents, comme des inhibiteurs enzymatiques et des promoteurs d'absorption [156,165,183].

Les promoteurs d'absorption sont des excipients conçus pour augmenter de façon transitoire et réversible la perméabilité de l'épithélium nasal, facilitant ainsi le passage des molécules d'intérêt ou de la formulation vers le SNC. Dans le cadre de l'approche N2B, la régulation de la perméabilité paracellulaire par ouverture réversible des jonctions serrées est l'approche la plus pertinente, notamment pour les macromolécules polaires et hydrophiles telles que les protéines et les anticorps qui ne peuvent traverser la membrane cellulaire par diffusion passive [156]. Les promoteurs d'absorption les plus étudiés pour l'administration intranasale se répartissent en cinq grandes catégories : les tensioactifs tels que les sels biliaires (taurocholate de sodium et désoxycholate) ou les lysophospholipides, les cyclodextrines (β-cyclodextrine), les inhibiteurs de protéases, les polymères cationiques tels que le chitosane et les modulateurs des jonctions serrées tels que la toxine de la zonula obstrue [165,184]. Ces agents exercent leurs effets par différents mécanismes : perturbation transitoire des jonctions intercellulaires, interaction avec la bicouche phospholipidique membranaire ou modification des propriétés de la barrière.

Xie et al. ont montré chez le rat que l'ajout de la bacitracine, un inhibiteur enzymatique, augmentait significativement l'absorption cérébrale du facteur de croissance nerveuse NGF administré par voie intranasale, avec environ 80 % du NGF intact retrouvé dans le cerveau, soulignant ainsi le rôle protecteur des inhibiteurs enzymatiques contre la dégradation nasale des protéines thérapeutiques [165].

Dans le cas spécifique des IgG, Kumar et al. (2018) ont démontré chez le rat qu'un prétraitement intranasal à la métalloprotéinase matricielle-9 (MMP-9) (par digestion de la matrice extracellulaire) améliorait significativement la distribution cérébrale des IgG marquées à l'iode-125 ([$^{125}$I]-IgG) [185]. Toutefois, il convient de souligner que l'utilisation de promoteurs d'absorption n'est pas sans risque : l'emploi de fortes concentrations de co-solvants ou de tensioactifs, ainsi qu'une acidification excessive du pH (inférieur à 4), peuvent induire des effets indésirables locaux tels qu'une irritation nasale ou des lésions épithéliales, rendant la muqueuse plus vulnérable à la pénétration d'allergènes exogènes [156,165,184].

# F. MODELES EXPERIMENTAUX D'EVALUATION DE LA PERMEABILITE NASALE

Différents modèles précliniques et méthodes expérimentales sont utilisés pour évaluer la pertinence d'une nouvelle molécule ou d'un nouveau système d'administration, mieux comprendre les mécanismes de transport à travers les barrières biologiques et, parfois, évaluer leur toxicité. Ces modèles présentent une complexité variable, allant de simples cultures cellulaires 2D à des cultures 3D ou des organoïdes, voire à des organes *ex vivo* et des modèles animaux *in vivo*. Leur objectif est de prédire le comportement des formulations ou des médicaments après leur administration dans l'organisme humain.

Cette section se concentrera sur les modèles 2D, 3D, *ex vivo* et *in vivo* développés pour l'étude de l'administration par voie nasale dans la stratégie N2B. Aussi, étant donné qu'une fraction du médicament administré par voie nasale pénètre dans la circulation systémique et traverse la barrière BHE, il semblait pertinent d'aborder également les modèles de BHE *in vitro*.

## F.1 Modèles *in vitro* de l'épithélium nasale

Les modèles *in vitro* sont des outils développés qui sont largement utilisés pour étudier la perméabilité de l'épithélium nasal, évaluer l'efficacité de nouvelles formulations intranasales et mieux comprendre les mécanismes de transport impliqués dans la délivrance de médicaments au cerveau. Ils permettent également d'évaluer la tolérance et, dans une certaine mesure, la toxicité des médicaments. Les principaux modèles cellulaires utilisés comprennent les cultures de cellules primaires, les lignées cellulaires immortalisées et d'autres modèles cellulaires [186].

Les cellules primaires sont isolées directement de l'épithélium nasal humain ou animal. Elles conservent les principales caractéristiques morphologiques et fonctionnelles du tissu d'origine, notamment leur capacité de différenciation, la production de mucus et la formation de jonctions serrées [186]. Ladel et al., ont développé des modèles à partir de cellules épithéliales porcines issues des régions olfactive (OEPC) et respiratoire (REPC), qui reproduisent fidèlement les propriétés de l'épithélium nasal *in vivo* [184] . Cependant, leur utilisation reste limitée par la faible disponibilité des tissus, une croissance plus lente et une variabilité interindividuelle importante [186,188].

Les lignées cellulaires immortalisées représentent une alternative plus simple et plus reproductible. Les plus utilisées sont les cellules RPMI 2650, Calu-3, 16HBE14o$^{-}$ et, dans une moindre mesure, les cellules Caco-2 [186]. La lignée cellulaire RPMI 2650, dérivée

d'un carcinome de la cloison nasale humaine, est le modèle de référence de l'épithélium nasal humain. Les cellules Calu-3, bien que dérivées d'un adénocarcinome pulmonaire, développent une monocouche polarisée avec des jonctions serrées fonctionnelles et une production de mucus relativement proche de celle observée *in vivo*. Les cellules 16HBE14o⁻ sont également utilisées pour leurs bonnes propriétés de barrière, tandis que les cellules Caco-2 servent principalement de modèle de criblage malgré leur représentativité limitée de la muqueuse nasale [186].

Ces modèles sont généralement cultivés sur des inserts (Transwell®) permettant la séparation d'un compartiment apical et d'un compartiment basolatéral et la reproduction de l'organisation de l'épithélium nasal. La culture à l'interface air-liquide (ALI) est privilégiée car elle mime mieux les conditions physiologiques et favorise ainsi la différenciation cellulaire, la formation de cils fonctionnels, la production de mucus et le développement des jonctions serrées. Cependant, la culture en milieu liquide (LCC) est moins représentative des conditions physiologiques [189].

Les barrières formées dans ces conditions sont caractérisées par la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER), ainsi que par des tests de perméabilité utilisant des marqueurs tels que le jaune de Lucifer, la fluorescéine sodique ou le dextran-FITC [186]. La différenciation des cellules épithéliales peut être suivit à travers des analyses complémentaires d'immunomarquage des protéines des jonctions serrées (ZO-1), des mucines (MUC5AC) ou des cils (α-tubuline acétylée) [187,189].

Plusieurs études ont montré que les cultures en ALI reproduisent plus fidèlement les propriétés fonctionnelles de l'épithélium nasal que les cultures en milieu immergé. De même, les cellules primaires présentent généralement une meilleure intégrité de la barrière muqueuse, une production de mucus plus importante et une ciliogenèse plus développée que la lignée cellulaire RPMI 2650, qui forme souvent des multicouches non représentatives du tissu natif [187].

Malgré certaines limitations, telles que la variabilité des conditions de culture, l'expression parfois réduite de certains transporteurs membranaires et la production de mucus limitée dans certaines lignées cellulaires, les modèles *in vitro* demeurent des outils essentiels pour le criblage précoce des formulations destinées à l'administration intranasale. Leur facilité de mise en œuvre, leur reproductibilité et leur faible coût en font des modèles largement utilisés avant les études *ex vivo*, puis *in vivo* [186].

## F.2 Modèles *ex vivo* de l'épithélium nasale

Les modèles *ex vivo* utilisent des tissus nasaux prélevés chez l'homme ou l'animal (porc, mouton, bovin ou chèvre) pour étudier la perméabilité des médicaments à travers la muqueuse nasale dans des conditions proches des conditions physiologiques.

Contrairement aux modèles cellulaires, ils préservent l'architecture tissulaire ainsi que les principales caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de l'épithélium, permettant ainsi d'évaluer le transport, le métabolisme, les phénomènes d'efflux et la toxicité locale potentielle des médicaments [186]. Les études de perméabilité sont généralement réalisées à l'aide de cellules de diffusion de Franz ou de chambres d'Ussing. Ces dispositifs sont constitués d'un système à deux compartiments : un compartiment donneur et un compartiment receveur, séparés par la membrane épithéliale excisée. Les cellules de Franz sont le plus souvent utilisées pour évaluer le passage des médicaments à travers la muqueuse nasale, tandis que les chambres d'Ussing permettent une viabilité tissulaire plus longue grâce à une oxygénation continue du milieu [186]. La région anatomique étudiée influence fortement les résultats obtenus. Plusieurs études ont montré que la perméation de certaines molécules, comme la dihydroergotamine, est plus importante à travers l'épithélium olfactif qu'à travers l'épithélium respiratoire, soulignant l'importance de cette région dans les stratégies d'administration directe de médicaments au cerveau [186].

Malgré leur meilleure représentation physiologique, les modèles *ex vivo* présentent certaines limitations. Leur durée d'utilisation est restreinte par la dégradation tissulaire après prélèvement, généralement après 3 à 4 heures. De plus, ces modèles sont sujets à des variabilités selon l'origine du tissu, les conditions expérimentales et la région anatomique étudiée. Comparés aux modèles *in vitro*, ils présentent généralement une perméabilité plus faible du fait de la distance de diffusion plus importante liée à la présence de toutes les structures tissulaires comme le tissu conjonctif, les glandes et le réseau vasculaire, qui constituent des barrières supplémentaires au transport du médicament [186,190].

Ainsi, les modèles *ex vivo* représentent une étape intermédiaire entre les modèles cellulaires *in vitro* et les études *in vivo*. Ils permettent une évaluation plus représentative de la perméabilité nasale tout en limitant le recours aux modèles animaux.

## F.3 Modèles *in vivo*

Les modèles *in vitro* et *ex vivo* constituent généralement une première étape dans les études précliniques. Ils permettent de sélectionner les molécules, formulations, concentrations ou conditions expérimentales les plus prometteuses avant leur évaluation *in vivo*. Cette approche limite le nombre de conditions à tester sur les animaux et s'inscrit dans une stratégie éthique de réduction de l'expérimentation animale, conformément au principe des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) [186,191] .

Les modèles *in vivo* demeurent essentiels pour évaluer l’efficacité d’une stratégie dans le développement des médicaments. Ils sont plus complets que les modèles *in vitro* et *ex vivo*, en prenant en compte tous les paramètres physiologiques susceptibles

d’influencer le devenir du médicament après administration intranasale. En plus des facteurs comme la clairance mucociliaire, la vascularisation de la muqueuse, le métabolisme local, l’absorption systémique ils disposent de l’intégralité des voies de transport vers le SNC. Ceci pourrait permettre de prédire les fractions systémiques par exemple et les fractions dans le LCR ou dans le compartiment cérébral. Ils permettent également de réaliser des études pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et de biodistribution, aussi bien chez l’animal sain que dans des modèles de pathologies neurologiques ou tumorales [156].

Le choix du modèle animal dépend des objectifs de l'étude, de la pathologie étudiée et des paramètres pharmacologiques recherchés. Les rongeurs, principalement les souris et les rats, sont les espèces les plus couramment utilisées en raison de leur faible coût, de la disponibilité de nombreux modèles pathologiques et de leur facilité de manipulation. Les espèces de plus grande taille, telles que les lapins, les chiens ou les primates non humains, présentent une anatomie nasale plus proche de celle de l'homme, mais leur utilisation reste limitée par des contraintes éthiques, réglementaires et économiques [148,156].

L’interprétation des études *in vivo* utilisant la stratégie N2B doit cependant être effectuée avec précaution. Comme indiqué précédemment (section A.5), les différences anatomiques entre les espèces, notamment la proportion beaucoup plus importante d’épithélium olfactif chez les rongeurs par rapport à l’homme, limitent l’extrapolation directe des résultats précliniques à la pratique clinique [156]. De plus, plusieurs paramètres expérimentaux influencent fortement les résultats obtenus, notamment le volume administré, la concentration de la formulation, le dispositif d’administration, la position de l’animal, l’utilisation d’anesthésie et le protocole d’instillation [148,156].

Parmi ces paramètres, le volume administré est un facteur particulièrement critique. Comme indiqué précédemment (section C.2), de nombreuses études chez les rongeurs utilisent des volumes représentant largement plus de 1 % du volume de la cavité nasale, ce qui peut entraîner des lésions de la muqueuse, modifier artificiellement sa perméabilité et conduire à une surestimation de l'efficacité de la voie N2B [102,148]. Ces différences méthodologiques constituent probablement l'une des principales explications des difficultés rencontrées lors de la transposition à l’échelle humaine de nombreuses approches précliniques prometteuses.

Ainsi, bien que les modèles animaux constituent actuellement le stade préclinique le plus représentatif pour évaluer la biodistribution cérébrale et l'efficacité pharmacologique des formulations intranasales, leurs limites anatomiques et méthodologiques doivent être prises en compte lors de l'interprétation des résultats et de leur extrapolation à l'homme.

# CHAPITRE 5 : VECTORISATION DANS LES SYSTEMES COLLOÏDAUX POUR L'APPROCHE N2B

## A. GENERALITE SUR LES SYSTEMES COLLOÏDAUX POUR L'APPROCHE N2B

Diverses technologies de délivrance de médicaments ont été développées pour améliorer l'administration intranasale de médicaments au SNC. Parmi les systèmes les plus étudiés on retrouve, les nanoparticules polymèriques, les liposomes, les nanoparticules lipidiques solides (SLN), les nanoémulsions, les micelles, les dendrimères et, plus récemment, les exosomes et autres systèmes colloïdaux (figure 17).

Comparés aux formes conventionnelles, ces systèmes offrent plusieurs avantages : ils peuvent protéger les molécules encapsulées de la dégradation enzymatique nasale, améliorer leur solubilité et leur perméabilité, réduire leur immunogénicité et/ou permettre un meilleur ciblage cérébral. Ces vecteurs améliorent l'absorption nasale par plusieurs mécanismes. Selon leur nature, ils peuvent prolonger le temps de contact avec la muqueuse nasale, accélérer leur diffusion à travers le mucus ou faciliter leur passage à travers l'épithélium par voies transcellulaire et paracellulaire. Leur surface peut également être modifiée afin d'optimiser leurs interactions avec l'épithélium : l'ajout de polymères mucoadhésifs améliore leur rétention (limitant ainsi la clairance mucociliaire), et la conjugaison de ligands spécifiques, tels que des peptides d'anticorps ou d'autres molécules, peut favoriser leur internalisation par les cellules épithéliales et améliorer le ciblage de la région olfactive.

Le choix du système de nanovecteurs le plus adapté dépend des propriétés physico-chimiques de la molécule active à encapsuler (sa solubilité, sa charge de surface, son caractère hydrophile ou lipophile, sa masse moléculaire et sa stabilité). Des critères de tolérance locale doivent également être pris en compte : le système doit être non irritant pour la muqueuse nasale, non neurotoxique et, idéalement, biodégradable et biocompatible. Toutes ces contraintes rendent la comparaison directe entre les différentes plateformes de nanomédicament difficile et justifient une approche au cas par cas.

Malgré leurs avantages, ces systèmes présentent certaines limitations. La capacité de chargement en principes actifs est parfois limitée, notamment pour les macromolécules de grande taille telles que les anticorps monoclonaux. Les systèmes

lipidiques, notamment les liposomes et les nanoparticules lipidiques, peuvent également présenter des problèmes de stabilité au stockage liés à des phénomènes de cristallisation ou d'agrégation, qui peuvent affecter l'homogénéité et la reproductibilité de la formulation.

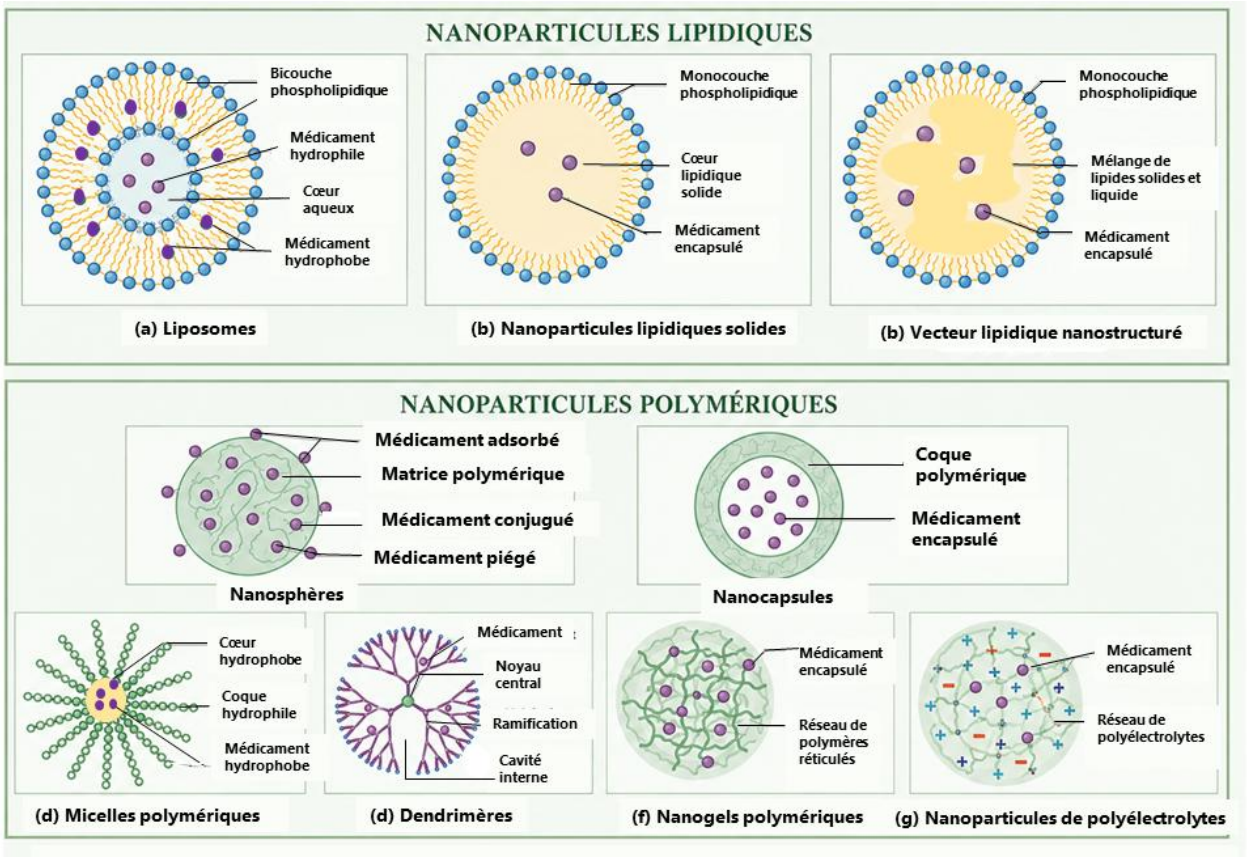



**Figure 17: Classification des systèmes nanoparticulaires pour la délivrance nasale de médicaments vers le SNC**. (Inspirée de Sarkar et al. 2017 [132]).

## A.1 Nanoparticules lipidiques

Les nanovecteurs comprennent principalement les liposomes, les nanoparticules lipidiques solides (SLN) et les nanoparticules lipidiques nanostructurées (NLC). Ces systèmes présentent plusieurs avantages : biocompatibilité, faible poids moléculaire et faible immunogénicité, capacité à solubiliser des molécules peu solubles et possibilité de fonctionnalisation de surface pour améliorer la perméabilité ou le ciblage cérébral. Leurs principales limitations résident dans leur faible stabilité, notamment lors du stockage, et une capacité de chargement restreinte, en particulier pour les macromolécules hydrophiles [156,192].

### A.1.1 Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques entourant un cœur aqueux. Ils sont généralement préparés par

hydratation-extrusion d'un film lipidique et possèdent la capacité unique d'encapsuler à la fois des molécules hydrophiles dans leur phase aqueuse interne et des molécules lipophiles au sein de leur bicouche [192]. Les propriétés de surface, notamment la charge et la fonctionnalisation par PEG, peuvent influencer significativement leur absorption et leur distribution après administration intranasale. Une étude préclinique chez le rat a comparé la distribution cérébrale de liposomes de moins de 100 nm en fonction de leur charge de surface. Les liposomes neutres PEGylés ont présenté la plus grande distribution cérébrale, atteignant l'ensemble du cerveau et de la moelle épinière en 60 minutes, avec une intensité croissante au fil du temps. Les liposomes neutres non PEGylés ont montré une fluorescence préférentielle dans le bulbe olfactif et la région antérieure du cerveau, tandis que les liposomes chargés négativement ont présenté la distribution la plus lente et la plus faible [193]. Pour les macromolécules, des liposomes cationiques (taille moyenne de 299 nm, potentiel zêta de +19 ± 1,5 mV, efficacité d'encapsulation de 94,3 %) ont été testés pour l'administration intranasale d'ovalbumine chez le rat. Les résultats ont montré une large distribution cérébrale dès 6 heures après l'administration, avec des concentrations cérébrales supérieures à celles obtenues avec l'ovalbumine libre [194]

### A.1.2 Les nanoparticules lipidiques solides

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) sont constituées d'un noyau lipidique solide (triglycérides, acides gras, monoglycérides, cires) dans lequel est dissous le principe actif, stabilisé par des tensioactifs [156]. Elles permettent la production de particules de taille variable (de 50 à 1000 nm). La méthode de préparation la plus courante est l'homogénéisation à haute pression ; cependant, les températures élevées qu'elle génère rendent la production incompatible avec les molécules thermosensibles. La microémulsion est une alternative actuellement en développement pour pallier cette limitation. Les SLN présentent un profil de libération biphasique caractéristique, avec une libération initiale rapide (*burst release*) suivie d'une phase de libération contrôlée. Leurs principales limitations sont une capacité de chargement réduite pour les molécules hydrophiles, une solubilité limitée du médicament dans le noyau lipidique et des risques d'agrégation lors du stockage [195]. L'encapsulation de macromolécules telles que les anticorps thérapeutiques dans les SLN reste encore largement inexplorée.

### A.1.3 Les nanoparticules lipidiques nanostructurées

Les nanoparticules lipidiques nanostructurées (NLC) sont des systèmes dérivés des SLN, conçus pour pallier à certaines de leur limitation. Grâce à une matrice composée de lipides solides et liquides, ils présentent une structure moins cristalline, permettant une meilleure incorporation du principe actif. Cette caractéristique améliore la capacité de chargement et la stabilité de la formulation lors du stockage. Les méthodes de préparation les plus couramment utilisées sont la double émulsification et l'homogénéisation à chaud sous haute pression.

## A.2 Nanovecteurs polymériques

Les nanovecteurs polymériques sont de plus en plus utilisées en nanomédecine en raison de leur flexibilité et de leur diversité structurelle [196]. Ces nanoparticules peuvent être préparées à partir de polymères naturels tels que le chitosane, la gélatine ou l'alginate, ou de polymères synthétiques comme les polyesters, notamment le poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), l'acide polylactique (PLA) et le poly(ε-caprolactone) (PCL)[156,197]. En fonction de la nature du polymère et la méthode de formulation, différentes morphologies peuvent être obtenues : nanosphères (cœur matriciel), nanocapsules (à enveloppe polymère contenant un cœur huileux ou aqueux), micelles polymères (formées par auto-assemblage de copolymères amphiphiles), polymersomes (vésicules de copolymères à blocs) et des nanogels [198–201]. Ces systèmes présentent plusieurs avantages par rapport aux nanovecteurs lipidiques : une stabilité accrue, une capacité d'encapsulation supérieure pour les molécules hydrophiles et lipophiles, un profil de libération contrôlée modulable et de multiples possibilités de modification de surface pour optimiser leurs propriétés pharmacocinétiques et leur ciblage cérébral [156]. Plusieurs polymères ont été étudiés pour le développement de systèmes d'administration N2B, notamment le PLGA, le PEG-PLGA, le PLGA-chitosane, le PEG-PCL et le chitosane [170,202–204]. Ces formulations ont démontré des résultats encourageants dans des modèles précliniques de transport de N2B. Dans le cadre de ce projet, le PLGA a été sélectionné comme système d'administration et une section spécifique lui sera consacrée.

### A.2.1 le chitosane

Le chitosane (CS) est un polysaccharide naturel, cationique, biocompatible, biodégradable et mucoadhésif, composé de N-acétylglucosamine et de D-glucosamine [205]. Le comportement du CS en solution est fortement dépendant du pH. Ce polymère, insoluble dans l'eau à pH neutre ou alcalin, devient soluble en milieu acide dilué (pH inférieur à 6,5) grâce à la protonation de ses groupements amine primaires ($R–NH_2 \rightarrow R–NH_3^+$). Cette ionisation confère au polymère un caractère polycationique, ce qui favorise sa solubilisation. À pH plus élevé, la déprotonation des groupements amine réduit les répulsions électrostatiques entre les chaînes et favorise leur agrégation, entraînant la précipitation du polymère [206]. Sa surface, chargée positivement par la présence de groupements amino primaires, présente une forte affinité pour les muqueuses chargées négativement [205,207]. Les propriétés polycationiques de ce polymère, associées à sa capacité à former des liaisons hydrogène inter- et intramoléculaires, le rendent particulièrement adapté aux formulations intranasales. Son principal mécanisme d'action repose sur l'ouverture transitoire et réversible des jonctions serrées de l'épithélium nasal, facilitant le transport paracellulaire des macromolécules, notamment les peptides, les protéines et les acides nucléiques, qui ne peuvent traverser la membrane cellulaire par diffusion

passive [206]. Les nanoparticules de chitosane (CS-NP) peuvent être préparées par différentes méthodes : gélification ionique avec des polyanions tels que le tripolyphosphate, nanoprécipitation, émulsification, coacervation ou formation de micelles inverses [205,206]. Plusieurs études précliniques ont démontré un transport accru du médicament vers le cerveau, attribué à la mucoadhésion des nanoparticules et à l'ouverture des jonctions serrées [202,206,207].

Le chitosane est également utilisé comme revêtement de surface pour d'autres systèmes de nanoparticules tels que le PLGA, les SLN et les NLC, afin d'améliorer leurs propriétés mucoadhésives et leur perméabilité épithéliale [205,206]. Plusieurs de ses dérivés ont également été synthétisés pour des applications spécifiques : le triméthyl chitosane (TMC), qui est soluble à pH physiologique, et les dérivés thiols du chitosane, qui présentent une mucoadhésion et une perméation améliorée, notamment grâce à un transport paracellulaire amélioré [202,208] .

# B. LES NANOPARTICULES DE PLGA

## B.1 Généralités et propriétés physicochimiques

Les polyesters synthétiques figurent parmi les familles de polymères les plus étudiées en nanomédecine, et certains ont permis la commercialisation de médicaments à libération contrôlée. Parmi eux, le poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) et l'acide polylactique (PLA) suscitent un intérêt particulier depuis plus de trente ans. Cet intérêt croissant se reflète dans la littérature scientifique. La base de données PubMed recense actuellement 5 704 articles publiés entre 1995 et 2026 avec les mots-clés « PLGA nanoparticles for drug delivery». Le PLGA est un copolymère composé d'acide lactique et d'acide glycolique (Figure 18), approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) et l'Agence européenne des médicaments (EMA) [156,198,209–211]. Sa biocompatibilité et sa biodégradabilité sont bien établies et par conséquent font de lui un bon candidat pour la conception de systèmes d'administration de médicaments. Différentes formes pharmaceutiques de microsphères, de nanoparticules, d'hydrogels et d'implants administrés par voie intramusculaire, sous-cutanée ou intra-articulaire sont disponibles. Les applications de ce polymère en tant que vecteur thérapeutique comprennent notamment la prise en charge du cancer de la prostate (Lupron Depot®, Zoladex®, Eligard®) et de l'arthrose du genou (Zilretta®) [212].

Le PLGA est un polymère hydrophobe, insoluble dans l'eau, dont les propriétés physico-chimiques sont hautement modulables selon trois paramètres clés (figure 18): le ratio massique acide lactique/acide glycolique (AL/AG), le poids moléculaire et la fonctionnalité du groupe terminal (acide terminal ou ester) [209,213–215]. Ces paramètres influencent directement la solubilité, le profil de dégradation et la cinétique de libération du principe actif.

Le ratio AL/AG équivalent à la proportion de chaque acide dans le polymère est particulièrement critique : l'acide lactique confère un caractère hydrophobe à la matrice, tandis que l'acide glycolique lui apporte un caractère hydrophile [213,214]. Plusieurs ratios sont disponibles : 50/50, 75/25, 65/35 et 85/15, permettant d'adapter la vitesse de dégradation aux besoins thérapeutiques ciblés [213,214].

La présence de groupements acide terminaux donne également la possibilité de fonctionnaliser la surface des nanoparticules par conjugaison avec différentes plateformes : PEGylation, enrobage de chitosane, association avec la lécithine ou conjugaison avec des ligands de ciblage tels que des anticorps ou des peptides [211,215,216]. Elle a également une influence sur la cinétique de libération ou de dégradation du polymère.

L’hydrolyse aqueuse du PLGA génère ses monomères constitutifs (l’acide lactique et l’acide glycolique), métabolisés naturellement dans l’organisme et transformés en eau et $CO_2$ par le cycle de Krebs (Figure 18) [209,217]. C’est cette dégradation en métabolites endogènes non toxiques qui confère au PLGA sa biocompatibilité.

La cinétique de dégradation dépend de plusieurs paramètres intrinsèques : la masse moléculaire du polymère, sa cristallinité, sa température de transition vitreuse (Tg), la teneur en acide lactique (composition du polymère), la concentration du polymère dans la formulation, le pH du milieu de libération, présence d’enzymes dans le milieu ainsi que la taille et la forme du système de délivrance [209,214]. En général, une masse moléculaire élevée et une teneur élevée en acide lactique tendent à prolonger le temps de dégradation [215].

De plus, les nanoparticules de PLGA présentent une excellente tolérance cellulaire. Au contact de cellules bronchiques humaines, elles n'induisent qu'une variation minime de la sécrétion de cytokines, confirmant l'absence de réaction inflammatoire significative [218].

La charge de surface des nanoparticules (négative, neutre ou positive) dépend du stabilisant utilisé et des fonctionnalisations de surface ; elle détermine leur profil de rayonnement et leur affinité pour les membranes biologiques [218]. Cette flexibilité permet aux nanoparticules de PLGA d’encapsuler des principes actifs hydrophiles et lipophiles dans des systèmes de tailles variables [162,170,211,215,219–221]. Ceci, offre ainsi une plateforme polyvalente pour la libération contrôlée des molécules d’intérêts vers diverses cibles thérapeutiques, notamment le SNC par voie intranasale.

Dans le domaine de l'encapsulation de protéines thérapeutiques, les nanoparticules de PLGA ont fait l'objet de nombreuses études. Elles permettent de protéger les protéines de la dégradation enzymatique, de préserver leur intégrité structurale et leur activité biologique, tout en optimisant leur biodisponibilité et leur ciblage thérapeutique [209,211,222]. De plus, le PLGA peut permettre la conception de systèmes à libération contrôlée [209–211,215,222,223].

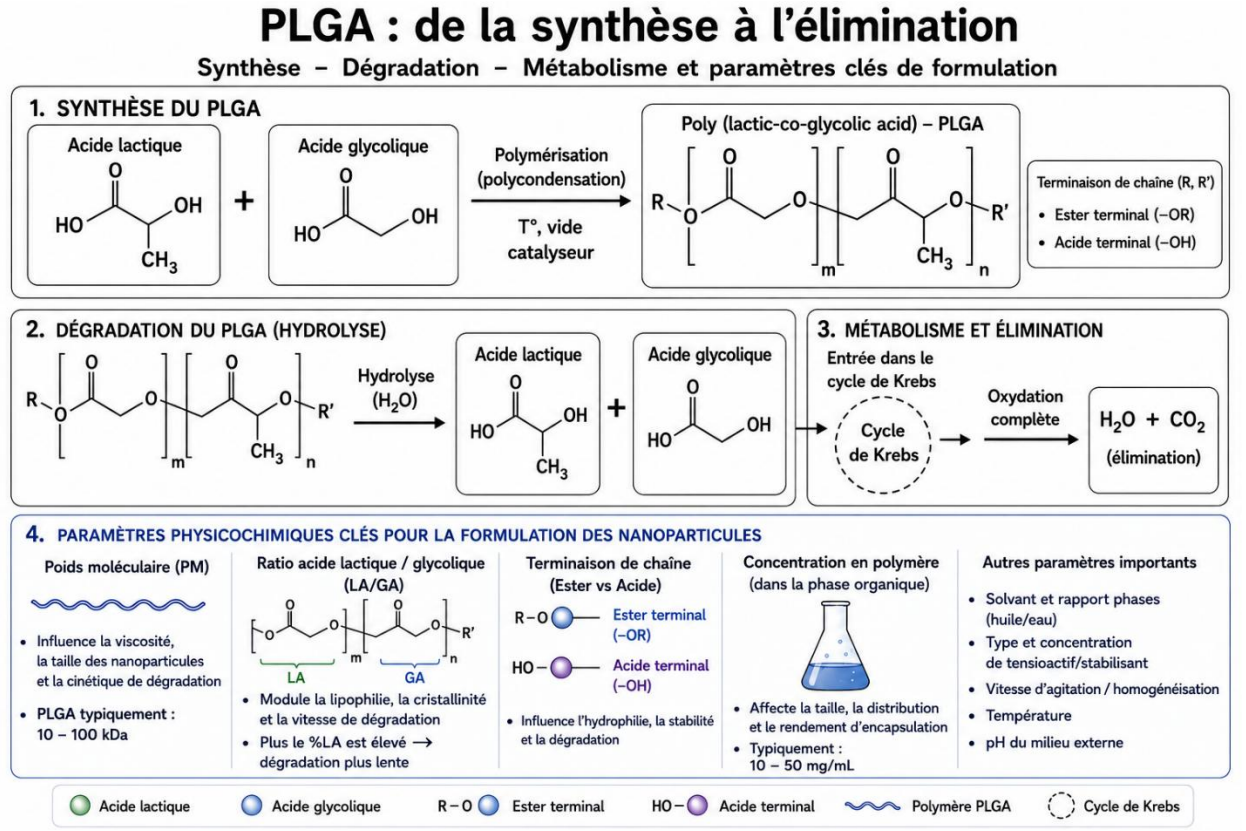



**Figure 18: PLGA synthèse, dégradation et paramètres de formulations clés**

## B.2 Méthodes de préparation

### B.2.1 Emulsion évaporation de solvant

Cette méthode est l'une des plus couramment utilisées pour la préparation de nanoparticules de PLGA, en raison de sa simplicité et de la grande variété de molécules qu'elle permet d'encapsuler. Les molécules hydrophobes sont généralement encapsulées par une simple émulsion huile /eau, tandis que les molécules hydrophiles, telles que les protéines ou les anticorps, nécessitent une double émulsion eau/Huile/eau [211,215,224]. Le procédé consiste à dissoudre le PLGA dans un solvant organique, puis à disperser dans une phase aqueuse. L'évaporation du solvant entraîne la formation de nanoparticules par précipitation du polymère (insoluble dans l'eau) encapsulant la molécule d'intérêt au sein de la matrice. Les particules obtenues sont ensuite lavées, récupérées par centrifugation ou dialyse, et éventuellement lyophilisées [215].

Cependant, la stabilité de la molécule à encapsuler est un paramètre critique à prendre en compte lors de la mise en œuvre de la méthode d'émulsification-évaporation de solvant. L'encapsulation de protéines thérapeutiques et d'anticorps par une double émulsion eau/huile/eau (E/H/E) présente des défis spécifiques liés à l'instabilité

structurale de ces macromolécules durant le processus de formulation [223,225]. Lors de la première étape d'émulsification, la protéine de la phase aqueuse interne est exposée à l'interface eau/solvant organique, où elle peut s'adsorber sur la matrice hydrophobe de PLGA, s'agréger ou se dénaturer sous l'effet du cisaillement mécanique appliqué lors de la formation de l'émulsion primaire [225,226]. Les protéines dénaturées ou agrégées qui en résultent perdent donc non seulement leur activité biologique, mais aussi peuvent également induire des effets indésirables, tels que l'immunogénicité [223]. De plus, l'activité biologique dépend de leur conformation tridimensionnelle ; toute altération structurale durant la formulation peut donc compromettre leur efficacité thérapeutique et leur innocuité. Pour pallier ces limitations, une étude de stabilité préliminaire dans les conditions de formulation est essentielle [225]. Plusieurs stratégies ont été proposées dans la littérature, notamment la sonication à froid sur glace pour limiter l'élévation de température pendant l'émulsification, ainsi que l'incorporation d'agents stabilisants tels que l'alcool polyvinylique (PVA), le poloxamère P188, le Pluronic F68, le polysorbate 80, le tréhalose, le bicarbonate de sodium ou l'albumine de sérum bovin (BSA), qui ont démontré leur capacité à préserver l'intégrité structurelle et l'activité biologique des protéines encapsulées au cours du processus [223,225].

### B.2.2 Nanoprécipitation

Elle consiste à dissoudre le polymère et le principe actif dans un solvant organique miscible à l'eau, tel que l'acétone, puis à ajouter goutte à goutte cette solution à une phase aqueuse contenant un stabilisant. La diffusion spontanée du solvant organique dans la phase aqueuse entraîne la précipitation instantanée du polymère et la formation de nanoparticules, qui sont ensuite récupérées par évaporation du solvant sous pression réduite et centrifugation. La nanoprécipitation est la méthode la plus couramment utilisée pour formuler des nanoparticules de PLGA chargées de petites molécules actives hydrophobes et peu solubles [211]. Bien que simple à mettre en œuvre et ne nécessitant aucune agitation mécanique, cette méthode est moins adaptée aux molécules hydrophiles, pour lesquelles l'encapsulation est médiocre [211,222].

### B.2.3 le salting-out

C’est une autre méthode de préparation de nanoparticules de PLGA, présentant l'avantage de limiter l'utilisation de solvants chlorés. Cette approche repose sur l'utilisation d'une forte concentration de sels, tels que le tétrahydrate d'acétate de magnésium, dans la phase aqueuse afin de réduire temporairement la miscibilité du solvant organique avec l'eau [222]. Le PLGA est dissous dans la phase organique, tandis que le sel et le stabilisant sont incorporés dans la phase aqueuse [222]. Une émulsion se forme alors, et l'ajout progressif d'eau provoque la diffusion du solvant organique dans la phase aqueuse et la précipitation du polymère sous forme de nanoparticules.

Ces nanoparticules sont ensuite purifiées, généralement par filtration tangentielle ou centrifugation, puis lyophilisées pour leur conservation. Cependant, cette méthode présente certaines limitations, notamment l'utilisation de fortes concentrations de sel, potentiellement incompatibles avec certaines biomolécules sensibles. D'autres techniques de formulation de nanoparticules de PLGA sont également décrites dans la littérature, telles que la diffusion de solvant et inversion de phase [215,220].

## B.3 les Stabilisants

La préparation de nanoparticules de PLGA par émulsion consiste à disperser une phase organique dans une phase aqueuse, créant ainsi une interface entre les deux solvants. L'ajout d'un agent stabilisant est essentiel pour stabiliser cette émulsion, notamment la tension interfaciale, ce qui permet de contrôler la taille et la stabilité des gouttelettes et, par conséquent, celles des nanoparticules formées [224,227]. Au-delà de la taille, le stabilisant peut s'adsorber à la surface des particules et moduler d'autres propriétés physico-chimiques clés telles que le potentiel zêta et la mucoadhésion, qui conditionnent la stabilité physique du système ainsi que ses propriétés biopharmaceutiques, notamment la libération du principe actif, sa biodistribution et son absorption cellulaire [224,227].

Parmi les agents stabilisants étudiés dans la littérature (Tween 80, Span 80, dérivés de cellulose, Pluronic 68, poloxamer 188, etc.), l'alcool polyvinylique (PVA) est le plus couramment utilisé pour la préparation de nanoparticules de PLGA [224,227,228]. Polymère hydrophile et biocompatible, le PVA présente une bonne résistance mécanique, une stabilité thermique faisant de lui un candidat de choix pour l'encapsulation de principes actifs pharmaceutiques et biopharmaceutiques [228].

Sa stabilisation est de nature stérique : il s'adsorbe à la surface des nanoparticules en formant des liaisons avec le polymère, limitant ainsi l'agrégation et permettant l'obtention de particules de taille inférieure à celle obtenue avec d'autres stabilisants tels que le Tween 20 ou le Span 20 [224,227,229,230]. Néanmoins, la présence de PVA résiduel en surface soulève une préoccupation quant à une cytotoxicité modérée, observée sur des cellules épithéliales pulmonaires humaines à de fortes concentrations (> 1 mg/mL) [231].

## B.4 Application des nanoparticules de PLGA en N2B

Les nanoparticules de PLGA présentent un fort potentiel pour améliorer le passage de la BHE, tant pour les petites molécules que pour les macromolécules. Par exemple, la lamotrigine encapsulée dans des nanoparticules de PLGA a montré une biodisponibilité cérébrale améliorée après administration intranasale chez le rat,

comparativement à une solution conventionnelle [204]. De même, la clonidine formulée dans des nanoparticules de PLGA a présenté une biodistribution cérébrale supérieure à celle de la solution libre [232].

Dans le cas des macromolécules, le bévacizumab (un anticorps anti-VEGF) encapsulé dans des nanoparticules de PLGA et administré par voie intranasale à des souris a présenté, après 7 jours, une biodisponibilité cérébrale environ quatre fois supérieure à celle du bévacizumab libre (5400 ± 2313 ng/g contre 1346 ± 391 ng/g de tissu cérébral), avec un temps de séjour prolongé dans le cerveau et une absence d'exposition systémique détectable, permettant ainsi de contourner la barrière hémato-encéphalique tout en limitant la toxicité [203]. Ces améliorations de perméabilité peuvent être encore amplifiées par fonctionnalisation de surface des nanoparticules. La conjugaison de la transferrine à la surface de nanoparticules de PLGA chargées en clonidine a significativement augmenté la concentration cérébrale par rapport aux nanoparticules non conjuguées, via un mécanisme de ciblage actif impliquant une interaction spécifique avec les récepteurs de la transferrine, favorisant leur internalisation par endocytose [232].

D'autres ligands de surface ont également été étudiés : le chitosane, un polymère mucoadhésif, améliore l'adhérence à la muqueuse nasale et la perméation. Les nanoparticules de PLGA-chitosane chargées en duloxétine (DX-PLGA-CH-NPs) ont présenté une perméation quatre fois supérieure à celle de la solution libre en 24 heures. La PEGylation, les conjugaisons à la lectines ou à la lactoferrine sont également connus pour favoriser respectivement la mucoadhésion des nanoparticules et faciliter leur transcytose via les récepteurs de lectine et de la lactoferrine de l'épithélium nasal [233–235].

# C. CARACTERISTIQUES DES NANOVECTEURS QUI AFFECTENT L'APPROCHE N2B

Les critères physicochimiques auxquels doivent répondre les nanovecteurs pour optimiser le transport N2B ne sont pas encore standardisés [156]. De manière générale, le devenir des nanoparticules après administration intranasale dépend d'un ensemble de paramètres interdépendants : leur taille, leur charge de surface, leur composition, leur type (systèmes polymériques, lipidiques, hydrogels *in situ*, etc.) et leurs propriétés de surface telles que la lipophilie ou la nature des ligands de ciblage [156]. Les **facteurs anatomophysioloques** doivent être pris en compte dans tous les cas.

La **taille** des particules est l'un des paramètres le plus crucial car elle constitue l'un des tout premiers paramètres à prendre en compte dans la stratégie N2B. La taille des pores du mucus nasal, d'un diamètre moyen de 200 nm, constitue une première barrière stérique directe au passage des nanoparticules. En effet, un diamètre au-dessus de ce seuil, est à l'origine du piégeage des nanoparticules dans le réseau de mucus.

Les jonctions serrées de l'épithélium nasal présentent une ouverture d'environ 3,9 à 8,4 Å, qui peut s'élargir de 10 à 15 fois en présence de promoteurs d'absorption. Cela implique que seules les entités d'un diamètre inférieur à 20 nm, telles que les peptides, les protéines ou les fragments d'anticorps, sont susceptibles d'emprunter la voie extracellulaire/paracellulaire [156].

De plus, le transport intra-axonal impose une contrainte dimensionnelle supplémentaire : le diamètre des axones olfactifs est compris entre 100 et 200 nm chez le lapin de deux mois, et entre 100 et 700 nm chez l'humain [236]. Ceci limite mécaniquement l'internalisation et le transport transcellulaire efficace des nanoparticules par cette voie. Ces considérations ont motivé plusieurs études évaluant l'impact de **la taille** sur le passage à travers l'épithélium nasal chez différentes espèces.

Une étude menée chez la souris par microscopie à fluorescence a montré que le transport de nanoparticules de polystyrène (100 et 200 nm), nues ou recouvertes de chitosane ou de polysorbate 80, était exclusivement transcellulaire, sans internalisation préférentielle dans les axones olfactifs, et une absence de détection dans le bulbe olfactif même pour les particules de 100 nm. Un diamètre inférieur à 100 nm semblerait constituer le seuil optimal pour un transport axonal efficace chez cette espèce [237].

La **charge de surface (potentiel zêta**), est un paramètre important influençant la pharmacocinétique cérébrale des nanoparticules après administration intranasale. Les nanoparticules chargées positivement interagissent facilement avec les glycanes du mucus et les membranes cellulaires chargées négativement, favorisant ainsi leur adhésion à la muqueuse nasale. Cependant, des études ont montré que les nanoparticules de PLGA chargées négativement peuvent atteindre différents

compartiments cérébraux après administration intranasale chez le rat. Mistry et al. 2015 ont étudié la perméabilité de nanoparticules de polystyrène, nues ou enrobées de chitosane, de tailles comprises entre 100 et 276 nm, à travers l'épithélium olfactif porcin *ex vivo* pour évaluer l'influence de la taille et la surfaces [236]. Leurs résultats ont montré que les particules chargées positivement étaient retenues dans la couche de gel muqueux, probablement par interactions électrostatiques avec les glycoprotéines anioniques du mucus, tandis que les particules chargées négativement diffusaient vers la couche de cellules épithéliales olfactives sans être internalisées dans les axones ; aucune nanoparticule n'a été détectée dans le bulbe olfactif [236]. La charge semble donc influencer le mécanisme de transport préférentiel : les nanoparticules chargées négativement empruntent préférentiellement la voie olfactive, tandis que celles chargées positivement transitent plus facilement par la voie trijumeau [236,238].

Outre la charge, la **composition chimique de la surface des nanoparticules** est un paramètre qui influence leur biodistribution. La fonctionnalisation de surface par des ligands tels que le chitosane, le PEG, les lectines ou la transferrine est largement utilisée pour optimiser la perméabilité à travers l'épithélium nasal [233–235,239].

# CHAPITRE 6 : FORMULATION DES ANTICORPS THERAPEUTIQUES

## A. GENERALITE SUR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

### A.1 Généralité

L'avènement de l'immunothérapie par anticorps monoclonaux (AcM) a considérablement amélioré la prise en charge de nombreuses maladies, notamment en hématologie, en rhumatologie et en oncologie. Grâce à leur ciblage spécifique et à une tolérance supérieure à celle de la chimiothérapie conventionnelle, cette approche thérapeutique connaît un large essor. À ce jour, plus d'une centaine d'anticorps monoclonaux ont été approuvés par la FDA, faisant de cette classe thérapeutique l'une des plus importantes du marché biopharmaceutique mondial [240]. Malgré leur haute spécificité et leur capacité à cibler sélectivement une cible thérapeutique, les anticorps monoclonaux nécessitent généralement des doses élevées pour obtenir un effet clinique suffisant [241–244].

Le trastuzumab, utilisé pour traiter le cancer du sein HER2-positif, en est un exemple. Il est administré par voie intraveineuse selon un schéma posologique comprenant une dose de charge de 8 mg/kg, suivie de doses d'entretien de 6 mg/kg toutes les trois semaines pour les métastases, ce qui représente environ 480 mg par perfusion pour un patient de 60 kg. Cette dose importante constitue un défi majeur pour le développement de la formulation, notamment lorsque l'objectif est de modifier la voie d'administration. Les voies sous-cutanée, intramusculaire ou, comme dans notre approche, intranasale imposent des contraintes spécifiques liées au volume administrable limité [241–243]. Par exemple, le faible volume injectable pour la voie sous-cutanées devrait être 1,5–2 mL. Les doses élevées nécessaires pour atteindre des concentrations systémiques thérapeutiques significatives d'anticorps monoclonaux posent des problèmes de formulation. Dans le cas de l'administration intranasale, la formulation doit délivrer une quantité suffisante d'anticorps dans un faible volume (100–200 µl), compte tenu du volume limité de la cavité nasale et du risque de lésion associé [241]..

Les propriétés physico-chimiques intrinsèques des anticorps monoclonaux peuvent également représenter un défi pour la formulation dans ces conditions. Aux concentrations élevées requises pour réduire le volume administré (par exemple 100 mg/ml de protéines), plusieurs paramètres peuvent être affectés, notamment la

viscosité, la solubilité, les interactions protéine-protéine et le risque d'agrégation [241,243].

Par conséquent, la faisabilité d'une formulation d'anticorps dépend de ses caractéristiques spécifiques, telles que sa stabilité intrinsèque, sa tendance à l'auto-association, son profil d'agrégation et son comportement en solution. Ces paramètres doivent donc être évalués et optimisés afin de maintenir l'activité biologique de l'anticorps tout au long du processus de formulation et d'administration.

## A.2 Structure et propriétés

Les anticorps monoclonaux sont des glycoprotéines appartenant à la famille des immunoglobulines qui interagissent spécifiquement avec un antigène cible défini. Il existe plusieurs classes et les anticorps thérapeutiques appartiennent majoritairement à la classe des IgG1 [248]. Leur structure est composée de quatre chaînes polypeptidiques dont deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L) liées par des ponts disulfures qui assurent la cohésion et la stabilité de la molécule. Les chaînes légères (L) peuvent être de type κ (kappa) ou λ (lambda). Les chaînes lourdes (H) existent en cinq isotypes : γ (gamma), μ (mu), α (alpha), ε (epsilon) et δ (delta). La nature de la chaîne lourde détermine la classe d'immunoglobulines : IgG (γ), IgA (α), IgM (μ), IgD (δ) et IgE (ε) [244,249].

Chaque chaîne possède un domaine variable (V) et un domaine constant (C). Les domaines variables contiennent trois boucles hypervariables appelées régions déterminant la complémentarité (CDR), directement responsables de la reconnaissance et de la liaison à l'antigène cible (figure 19).

L'anticorps est constitué de deux régions fonctionnelles principales : le fragment Fab (fragment de liaison à l'antigène), responsable de la reconnaissance de l'antigène et de la liaison spécifique via les CDR, et le fragment Fc (fragment cristallisable). Ce dernier comprend les domaines constants CH2 et CH3 des chaînes lourdes ainsi que la région charnière [249]. Il joue un rôle dans les fonctions effectrices de l'anticorps, notamment dans les interactions avec les récepteurs Fc, et influence sa demi-vie plasmatique.

Avec un poids moléculaire d'environ 150 kDa et un diamètre hydrodynamique compris entre 10 et 15 nm, les anticorps entiers sont des macromolécules. Ces caractéristiques limitent leur diffusion à travers certains tissus et réduisent leur accès à des cibles difficiles d'accès. Cette contrainte est particulièrement importante dans le contexte du SNC, où la BHE limite fortement leur pénétration. Le génie moléculaire a permis le développement de nouveaux formats d'anticorps plus petits que les anticorps entiers. Il s'agit notamment des fragments F(ab')2 (100 kDa), Fab (50 kDa), des scFv (single-chain variable fragments 27 kDa), minibodies (80 kDa) diabodies (50 kDa) et des

nanobodies (13 kDa) (figure 20). Ces formats présentent des propriétés pharmacocinétiques différentes et pourraient ouvrir de nouvelles perspectives en matière de diagnostic et de thérapie, en particulier pour les applications cérébrales [250,251]. Les fragments d'anticorps peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres molécules pour générer une grande variété de formats d'anticorps, notamment des molécules bispécifiques, multispécifiques ou multifonctionnelles, élargissant ainsi leurs applications thérapeutiques [251,252].

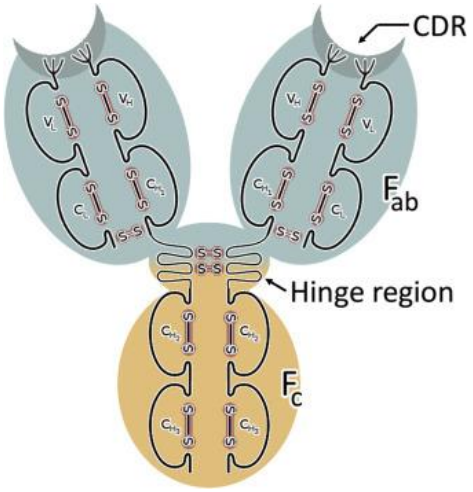



**Figure 19: Structure générale des anticorps.** Fc, fragment cristallisable ; Fab, fragment de liaison à l'antigène ; V, domaine variable ; C, domaine constant ; L, chaîne légère ; H, chaîne lourde ; S-S, liaison disulfure [250]

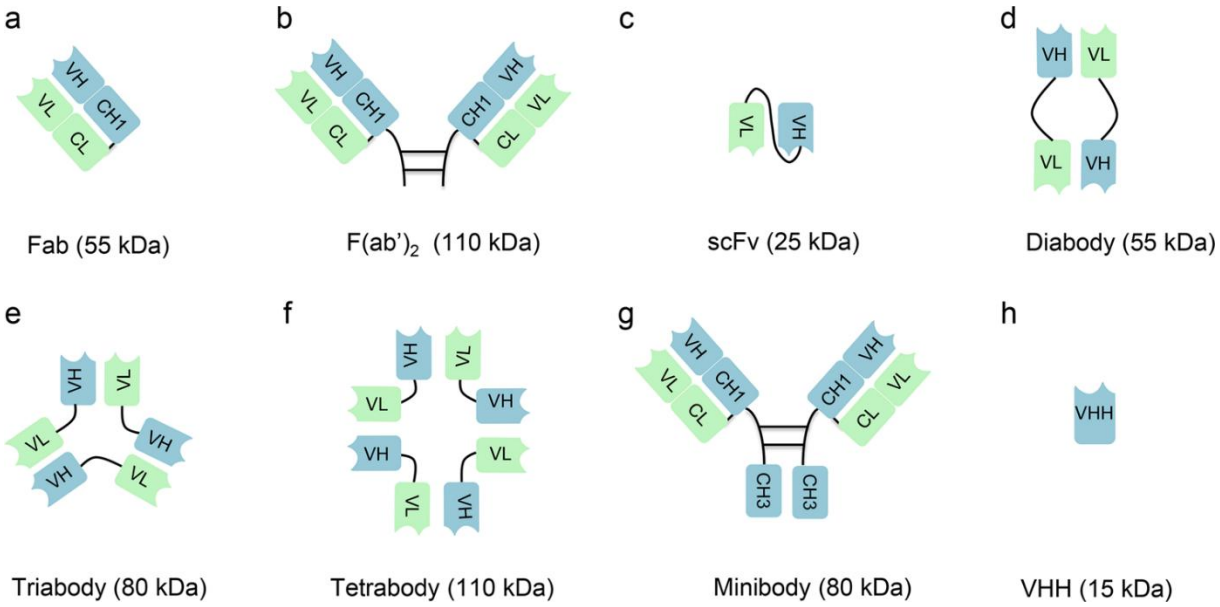



**Figure 20: Différents formats de fragments d'anticorps et leurs dérivés. [253]**

# B. RATIONNEL DE LA FORMULATION DES ANTICORPS THERAPEUTIQUES

De par leur nature protéique, les anticorps monoclonaux sont sensibles à divers facteurs physico-chimiques tels que la température, la lumière, les variations de pH, l'agitation, les contraintes mécaniques, les cycles de congélation-décongélation et la présence de contaminants. La formulation vise donc à préserver leur structure tridimensionnelle et par conséquent leur fonctionnalité tout au long du cycle de vie du produit, de sa fabrication à son administration au patient. Une formulation inadaptée peut entraîner une perte d'efficacité, la formation de produits de dégradation potentiellement immunogènes et donc une modification du profil de sécurité du médicament. Par ailleurs, l'évolution des modes d'administration, notamment le passage de la voie intraveineuse à des voies plus concentrées comme l'injection sous-cutanée ou intranasale, impose de nouvelles contraintes [247]. Ces formulations nécessitent un contrôle de la viscosité, une limitation de l'agrégation et une réduction de l'adsorption aux surfaces [245,247] .

## B.1 principaux mécanismes de dégradation des anticorps

L'oxydation et la désamidation sont parmi les phénomènes de dégradation chimique les plus fréquemment observés pour les anticorps monoclonaux. Elles peuvent altérer la structure et les propriétés de la protéine, notamment sa charge, son hydrophobicité et sa conformation tridimensionnelle. Ces modifications peuvent favoriser l'instabilité, le dépliement et l'agrégation des anticorps, pouvant potentiellement entraîner une perte d'activité biologique, une modification de la demi-vie ou une diminution de l'efficacité thérapeutique.

### B.1.1 Oxydation

L'oxydation est une modification chimique fréquente des protéines thérapeutiques. Certains acides aminés sont plus sensibles à l'oxydation, notamment la méthionine, la cystéine, l'histidine, le tryptophane et la tyrosine [244,254,255]. L'oxydation de ces chaînes peut survenir pendant toutes les étapes de la production, la purification, la formulation et même pendant le stockage des protéines. Dans les anticorps, certains résidus de méthionine situés dans le fragment Fc, notamment aux positions Met255 et Met431 de la chaîne lourde, constituent des sites d'oxydation préférentiel [242,244]. Cette réaction conduit principalement à la formation de sulfoxyde de méthionine [254]. La formation de certains résidus peut altérer la stabilité conformationnelle de l'anticorps et induire des changements dans leur structure d'une part et d'autre part

accroître le risque d'agrégation et affecter certaines propriétés biologiques de la molécule [254,256]. L'analyse ou l'identification des modifications oxydatives repose principalement sur des approches analytiques comme la spectrométrie de masse (SM) [242,254]. Pour limiter ce phénomène, différentes stratégies de formulation peuvent être utilisées, notamment l'ajout d'antioxydants tels que la méthionine libre, le thiosulfate de sodium ou des chélateurs de métaux tels que l'EDTA.

### B.1.2 Désamidation

La désamidation est une modification chimique spontanée qui affecte principalement les résidus d'asparagine (Asn) et, dans une moindre mesure, de glutamine (Gln). Elle conduit à leur conversion respective en acide aspartique (Asp) ou en acide glutamique (Glu) [242,244,248,255]. Cette transformation confère une charge négative supplémentaire à la molécule et peut altérer certaines propriétés physico-chimiques de l'anticorps, notamment sa charge globale, son hydrophobicité et sa conformation tridimensionnelle. Ces modifications peuvent diminuer la stabilité de la protéine en facilitant son dépliement et en augmentant le risque d'agrégation [242,244]. La désamidation des résidus d'asparagine et l'isomérisation des résidus d'acide aspartique situés dans les régions CDR constituent des modifications chimiques critiques des anticorps monoclonaux, car elles peuvent affecter directement leur affinité pour l'antigène. Cette vulnérabilité est particulièrement marquée pour le trastuzumab, qui possède deux sites de désamidation identifiés (Lc-Asn30 et Hc-Asn55) et un site d'isomérisation (Hc-Asp102) dans ses régions variables. En conditions de stress, la désamidation de Lc-Asn30 et l'isomérisation de Hc-Asp102 peuvent survenir, cette dernière étant particulièrement susceptible d'altérer l'activité biologique du trastuzumab [257]. Ces résultats soulignent l'importance d'optimiser les paramètres de formulation, notamment le pH et la force ionique, afin de limiter ces modifications et de préserver l'activité du trastuzumab.

La détection ou l'analyse des formes désamidées repose sur diverses techniques analytiques, telles que la focalisation isoélectrique (IEF), la chromatographie d'échange de cations (CEX-HPLC) et la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) [242]. L'optimisation du pH et de la force ionique de la formulation constitue une stratégie pour atténuer ce phénomène [244].

### B.1.3 Agrégation

L'agrégation protéique représente la manifestation la plus courante de l'instabilité physique et est un des défis majeurs de la formulation d'anticorps à haute concentration [242,244,247]. Elle résulte de l'exposition transitoire de domaines hydrophobes normalement internalisés, induisant des contacts et interactions (covalente ou non) protéine-protéine qui entraînent la formation de dimères, d'oligomères et d'agrégats de haut poids moléculaire [242,247]. Ces agrégats peuvent être réversibles ou irréversibles [256]. L'agrégation peut avoir de multiples causes, telles

qu'un repliement incorrect lors de l'expression protéique et une perturbation de la conformation native pendant plusieurs processus (la purification, la formulation, la congélation-décongélation, la lyophilisation, l'ultrafiltration, le remplissage de flacons et de seringues, le transport ou le stockage des protéines) [255]. Ces procédés peuvent compromettre la stabilité du produit en exposant les protéines à des conditions potentiellement dommageables, comme la congélation, la déshydratation, les pH extrêmes, les interfaces air-liquide, les interfaces solide-liquide ou les températures élevées ou basses.

L'agrégation peut altérer l'affinité de liaison, la demi-vie et l'efficacité du produit. Elle constitue un problème de sécurité important en raison du risque immunogène, de toxicité rénale associé aux agrégats protéiques [242,244,255]. Le taux d'agrégats dans les produits d'immunoglobulines intraveineuses commercialisés est limité à moins de 5 % selon les normes de l'OMS [244]. En pratique, sa détection est réalisée par chromatographie d'exclusion stérique (SE-HPLC), diffusion dynamique de la lumière (DLS) et microscopie à contraste de phase [242,247,258]. Les cycles de congélation-décongélation, l'agitation, les concentrations élevées, la viscosité, la lyophilisation et les variations de la force ionique et de pH sont des facteurs de risques importants de la formation d'agrégats [242,244,258]. Il n'existe pas de seuil de concentration unique à partir duquel l'agrégation se produit. Par exemple, un anticorps IgG1 à des concentrations allant de 2,7 à 50 mg/mL a montré une augmentation progressive de l'opalescence de la solution, indiquant une association croissante entre les molécules d'anticorps. Cependant, ces interactions sont restées largement réversibles et n'ont pas conduit principalement à la formation d'agrégats irréversibles [244].

### B.1.4 Fragmentation/hydrolyse

Il s'agit d'une dégradation de la protéine par hydrolyse. Elle peut être enzymatique ou chimique, et se produire au niveau de la région charnière ou d'autres sites sensibles de la molécule. Les séquences les plus susceptibles de conduire à une fragmentation des protéines sont Asp-Gly et Asp-Pro [244]. Diverses conditions de traitement peuvent accélérer la fragmentation des anticorps, telles que les traitements acides ou basiques, les traitements thermiques, les cycles de congélation-décongélation, et le stockage [244]. Une surveillance peut être faite par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) et par chromatographie liquide à haute performance en phase solide (SE-HPLC) [242]. Les formes fragmentées sont généralement présentes en faibles quantités et ont peu d'impact sur l'efficacité. Cependant, une fragmentation importante peut altérer la biodistribution de l'anticorps et compromettre son profil de sécurité, ce qui est particulièrement préoccupant dans le contexte des anticorps conjugués à des agents cytotoxiques [242].

# C. PRINCIPALES STRATEGIES DE FORMULATION CONVENTIONNELLES POUR AMELIORER LA STABILITE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

La formulation d'un anticorps thérapeutique a pour but principal de limiter sa vitesse de dégradation afin de maintenir sa stabilité et son efficacité tout au long de son stockage et de son utilisation [248,259]. Ceci repose sur la sélection d'excipients appropriés et l'optimisation des paramètres physico-chimiques de la formulation. Cependant, la stabilisation d'un anticorps dépend fortement de ses caractéristiques propres : un excipient efficace pour une molécule peut s'avérer inefficace, voire induire l'instabilité, pour une autre, en raison de différences de structure moléculaire et de surface [259]. Une formulation adaptée doit donc préserver la fonctionnalité de l'anticorps, limiter les risques d'immunogénicité et garantir sa stabilité dans le temps.

## C .1 Tampons et contrôle du pH

Le pH est un facteur déterminant pour la stabilité des anticorps monoclonaux, car il influence leur charge électrique, leur solubilité et leurs interactions intermoléculaires. Un pH inadapté peut favoriser diverses voies de dégradation [248]. L'utilisation de tampons pour stabiliser les protéines est associé à leur capacité à moduler les variations de pH [255]. La concentration d'anticorps à tamponner est importante. En effet, pour de nombreuses formulations protéiques, notamment lorsque la concentration protéique est relativement élevée, c'est la protéine elle-même, et non le tampon, qui assure la majeure partie du pouvoir tampon [255].

Des conditions trop acides peuvent accélérer certains processus tels que la fragmentation ou l'isomérisation, tandis qu'un pH plus élevé peut favoriser la désamidation et l'oxydation, pouvant entraîner une agrégation des protéines [255]. En général, les formulations d'anticorps sont souvent développées dans une plage de pH légèrement acide, généralement comprise entre 5 et 6, afin d'améliorer leur stabilité [259,260]

Parmi les systèmes tampons utilisés dans les formulations, l'histidine est largement employée pour les anticorps à forte concentration, en particulier dans les formulations destinées à l'administration sous-cutanée. Les tampons citrates et phosphates sont plus couramment utilisés dans les formulations injectables à faible concentration, notamment pour l'administration intraveineuse [259].

## C.2 Sucres et polyols : stabilisants thermodynamiques

Les sucres et les polyols sont couramment utilisés pour stabiliser les anticorps monoclonaux. Leur effet repose principalement sur un mécanisme d'exclusion préférentielle : ils favorisent le repliement de la protéine en augmentant la stabilité thermodynamique de sa structure native [248,255]. D'autre part les sucres et les polyols peuvent complexer les métaux à fortes concentrations protégeant ainsi des dommages induits par l'oxydation des métaux [255]. Lors des processus de congélation ou de lyophilisation, ces excipients remplacent également partiellement les molécules d'eau autour de la protéine par la formation de liaisons hydrogène, limitant ainsi les dommages structuraux [248].

Les sucres non réducteurs, tels que le saccharose et le tréhalose, sont privilégiés car ils ne réagissent pas avec les groupements amine des protéines et évitent les réactions de glycation. Le saccharose est notamment utilisé dans plusieurs formulations d'anticorps à haute concentration, comme la formulation sous-cutanée de trastuzumab (Herceptin SC®) [248]. Le mannitol est également utilisé comme agent de charge dans les formulations lyophilisées. Cependant, son effet protecteur est généralement inférieur à celui des sucres amorphes tels que le saccharose ou le tréhalose [248].

## C.3 Tensioactifs : protection de l'interface

Les anticorps monoclonaux peuvent être sensibles aux interfaces, notamment lors de l'agitation, du remplissage des flacons, de la congélation ou de la nébulisation. Ces contraintes peuvent favoriser l'adsorption des protéines aux surfaces et leur agrégation [248,255]. C'est pourquoi des tensioactifs non ioniques sont fréquemment ajoutés aux formulations afin de protéger l'anticorps contre ces interactions lors du stockage, de la filtration, de la purification et du transport. Ils se lient préférentiellement aux interfaces, limitant ainsi le contact direct entre la protéine et les surfaces hydrophobes [248,255,259]. Les polysorbates 20 et 80 (Tween 20 ® et Tween 80 ®), ainsi que le poloxamère 188, figurent parmi les tensioactifs les plus couramment utilisés dans les formulations d'anticorps thérapeutiques [259]. Toutefois, il convient de noter que l'utilisation de tensioactifs non ioniques peut entraîner des effets indésirables. Par exemple, bien que le polysorbate 80 inhibe l'agrégation de l'IL-2 mutée induite par l'agitation, il augmente l'oxydation et l'agrégation de la protéine lors d'un stockage prolongé [255]. Leur concentration doit être contrôlée, car un excès de tensioactif peut altérer la structure de la protéine et favoriser son dépliement [248,255].

## C.4 Acides aminés : stabilisants multifonctionnels

Certains acides aminés peuvent améliorer la stabilité des anticorps, notamment dans les formulations très concentrées [259]. L'arginine est particulièrement utile car elle augmente la solubilité des protéines, réduit leur agrégation et diminue la viscosité des solutions concentrées. Cette propriété est particulièrement intéressante pour les formulations nécessitant de faibles volumes d'administration, comme les injections sous-cutanées ou intranasales [248]. Le mécanisme à l'origine de l'effet stabilisant de l'arginine pourrait être sa forte tendance à se lier à des surfaces spécifiques d'anticorps monoclonaux (telles que les groupes carboxylates et les interactions cation-π avec les chaînes latérales aromatiques) et à renforcer la répulsion électrostatique entre les molécules d'anticorps chargées positivement [248].

La méthionine libre, le thiosulfate, l'acétyltryptophane peuvent également être ajoutés comme antioxydant sacrificiel afin qu'ils soient oxydés à la place de la protéine d'intérêt [248,255]. Elle protège les résidus de méthionine sensibles de l'anticorps en étant oxydée préférentiellement à la place de la protéine thérapeutique.

## C.5 Autres excipients

Les métaux traces provenant des matières premières ou des équipements de fabrication peuvent favoriser la production d'espèces réactives de l'oxygène et accélérer l'oxydation des protéines [244,248,255].

L'ajout **d'agents chélateurs** tels que l'EDTA permet de complexer ces ions métalliques réduisant leur réactivité et par conséquent limite les réactions d'oxydation [248,259]. Il convient de noter que l'affinité de liaison de l'EDTA diminue significativement en dessous d'un pH de 5, lorsque les chaînes latérales carboxylates sont protonées.

L'ajout de **sels** tels que le chlorure de sodium (NaCl) permet également d'ajuster la force ionique et l'isotonicité de la formulation. À de faibles concentrations, les ions peuvent limiter les interactions protéiques et améliorer la stabilité colloïdale. Cependant, des concentrations excessivement élevées peuvent, à l'inverse, favoriser l'agrégation par un effet de précipitation (« salting-out ») [259].

Enfin, la lyophilisation est une stratégie importante pour améliorer la stabilité à long terme des anticorps. En réduisant la quantité d'eau disponible, elle ralentit plusieurs réactions de dégradation chimique, notamment l'oxydation, la désamidation et l'agrégation. Des agents protecteurs tels que le saccharose ou le tréhalose sont souvent utilisés lors de ce procédé afin de préserver la structure tridimensionnelle de l'anticorps pendant la dessiccation.

# D. FORMULATIONS INNOVANTES DES ANTICORPS THERAPEUTIQUES

## D.1 Considérations générales

La plupart des anticorps monoclonaux disponibles dans le commerce sont administrés par voie parentérale (IV, SC ou IM) car les autres voies d'administration, telles que les voies orale, pulmonaire ou nasale, présentent une faible biodisponibilité [243,261]. Cette limitation est principalement due à leur grande taille moléculaire (~150 kDa), à leur nature hydrophile et à leur sensibilité à la dégradation enzymatique et chimique [243]. Le développement de formulations adaptées à ces voies d'administration doit donc relever simultanément deux défis distincts : assurer la stabilité physico-chimique de l'anticorps par rapport aux conditions rencontrées dans la voie d'administration, et améliorer sa perméabilité à travers les épithéliums muqueux. Face aux défis spécifiques posés par chaque voie d'administration non parentérale, plusieurs stratégies complémentaires ont été développées, combinant la modification du format des anticorps, l'optimisation des excipients protecteurs et la mise au point de systèmes d'administration innovants. Ces approches doivent être individualisées, car les contraintes rencontrées diffèrent selon la voie considérée, et chaque produit biologique requiert une optimisation spécifique en termes de stabilité, de charge protéique et de dosage [243].

Pour **l'administration pulmonaire**, les principaux défis concernent les contraintes mécaniques générées lors de la nébulisation ou de l'aérosolisation, susceptibles d'entraîner la dénaturation ou l'agrégation des anticorps [243,262,263]. Le développement de formulations adaptées nécessite donc l'optimisation des excipients afin de préserver leur stabilité pendant la fabrication, le stockage et l'administration [263]. L'insuline inhalable Afrezza®, approuvée par la FDA, démontre la pertinence de cette approche, mais le développement des biothérapies inhalées demeure complexe, comme l'illustre l'arrêt de la commercialisation d'Exubera® malgré des résultats cliniques encourageants [243].

Pour **l'administration orale**, les contraintes sont principalement physiologiques : l'acidité gastrique élevée (pH 1–2), la présence de protéases digestives et les enzymes intestinales dégradent rapidement les anticorps intacts avant leur absorption. À cela s'ajoutent les contraintes pharmaceutiques liées aux formes lyophilisées (gélules, comprimés), qui exigent une stabilité à l'état solide et une redispersibilité adéquate après dissolution [243].

Pour la **voie nasale**, principale voie d'administration de notre étude, les limitations sont nombreuses et interdépendantes. La faible surface de la muqueuse nasale (environ 150 à 180 $cm^2$), dont seule une fraction est accessible, restreint les volumes administrables et limite la dose maximale délivrable. La présence d'enzymes protéolytiques à la surface de l'épithélium nasal, expose les anticorps à une dégradation rapide avant absorption [243,261]. À cela s'ajoutent le risque d'irritation de la muqueuse, la clairance mucociliaire qui élimine les particules déposées.

Pour pallier ces différentes contraintes, plusieurs stratégies adjuvantes ont été développées et adaptées à chaque voie d'administration. L'ajout d'inhibiteurs de protéases contribue à limiter la dégradation enzymatique locale. Les promoteurs d'absorption, les tensioactifs, les sels biliaires et les cyclodextrines améliorent le passage transépithélial en augmentant temporairement la perméabilité membranaire. Les agents mucoadhésifs (chitosane, acide hyaluronique) prolongent le temps de contact avec l'épithélium en retardant la clairance mucociliaire, tandis que les agents mucopénétrants (nanoparticules PEGylées) permettent une pénétration active de la couche de mucus jusqu'à l'épithélium sous-jacent [243,264,265]. Pour la voie sous-cutanée, l'hyaluronidase recombinante est utilisée pour dépolymériser la matrice extracellulaire et faciliter la diffusion locale de volumes supérieurs à 2 ml. Cette stratégie a notamment été employée dans la formulation sous-cutanée du trastuzumab (Herceptin SC®) [243,245,246,266].

Au-delà des stratégies classiques d'optimisation des excipients, deux approches innovantes méritent une attention particulière pour l'administration d'anticorps monoclonaux par voie non parentérale : l'utilisation de formats alternatifs à l'anticorps entier (fragments Fab, scFv, nanocorps) et la nanovectorisation au sein de systèmes colloïdaux.

## D.2 Formats alternatifs

L'une des stratégies les plus étudiées consiste à réduire la taille de la molécule thérapeutique par fragmentation contrôlée ou ingénierie moléculaire afin d'améliorer sa perméabilité muqueuse. Des formats alternatifs tels que les fragments Fab (~50 kDa), les fragments scFv (~27 kDa), les nanobodies (~13 kDa) et les diabodies présentent des profils de distribution tissulaire très différents de ceux de l'IgG entière, avec une pénétration muqueuse potentiellement accrue [250,252].

Plusieurs études ont évalué l'influence de la taille des anticorps sur leur distribution tissulaire. Parmi elles, l'étude de Li et al. (2016) a analysé le coefficient de distribution tissulaire de différents formats d'anticorps en fonction de leur taille moléculaire. Les auteurs ont montré que la réduction de la taille des anticorps favorisait une meilleure

distribution tissulaire [252]. Cependant, cet effet variait selon les organes, notamment entre les tissus à perméabilité élevée ou faible. Dans le cerveau, le fragment $F(ab')_2$ a présenté un coefficient de distribution plus de dix fois supérieur à celui de l'anticorps monoclonal entier. Les auteurs attribuent cette augmentation à deux facteurs : premièrement, la réduction de la taille moléculaire, qui facilite le passage à travers la BHE ; deuxièmement, l'absence du fragment Fc, qui contribuerait activement à l'efflux des anticorps monoclonaux du parenchyme cérébral via les récepteurs FcRn exprimés sur l'endothélium de la BHE [252]. Ces résultats soulignent l'intérêt de formats tronqués alternatifs pour améliorer la biodisponibilité cérébrale des anticorps thérapeutiques et renforcent la justification de l'utilisation de stratégies de nanovectorisation capables de contourner ces mécanismes d'efflux actifs.

Cependant, ces formats peuvent avoir une demi-vie plus courte et nécessitent souvent des stratégies complémentaires [267,268]. La PEGylation de ces fragments, en prolongeant leur demi-vie plasmatique et en réduisant leur immunogénicité, constitue une stratégie complémentaire pour compenser leur clairance rénale plus rapide tout en améliorant leur stabilité dans les voies muqueuses [269,270].

## D.3 Nanovectorisation

L'administration d'anticorps par des systèmes tels que la microencapsulation, les liposomes et les nanoparticules polymères ou lipidiques représente une approche prometteuse pour pallier les limitations liées à l'administration non intraveineuse d'anticorps [241,243]. Ces systèmes protègent les anticorps de la dégradation enzymatique, améliorent leur stabilité, contrôlent leur libération et peuvent potentiellement accroître leur biodisponibilité dans les tissus cibles. Ils facilitent également le franchissement des barrières biologiques, notamment les muqueuses, tout en offrant la possibilité de développer des méthodes d'administration moins invasives [170,219].

C'est dans cette optique que nous avons choisi, dans ce travail, d'encapsuler le trastuzumab dans des nanoparticules de PLGA afin de le protéger de la dégradation muqueuse pour une approche N2B. Cette stratégie soulève cependant des défis de formulation spécifiques qui doivent être pris en compte : la sensibilité du trastuzumab aux solvants organiques utilisés pour la préparation des nanoparticules de PLGA (acétate d'éthyle, dichlorométhane), aux forces de cisaillement générées par sonication lors de l'étape d'émulsification, et à l'interface eau-solvant organique créée par la double émulsion. Ces paramètres influencent directement l'intégrité structurale et la fonctionnalité du trastuzumab encapsulé et constituent un axe central du développement pharmaceutique présenté dans ce travail [271,272,273].

# RESUME DE L'ETAT DE L'ART

Pour qu'un médicament soit efficace, il est indispensable d'acheminer une dose optimale de la molécule thérapeutique jusqu'à sa cible. En effet, l'efficacité clinique de tout médicament repose principalement sur l'interaction entre la molécule thérapeutique et sa cible. Lorsque l'organe cible est le cerveau, sa biodisponibilité dans le parenchyme cérébral se heurte à un obstacle majeur dû à la présence d'une barrière physiologique appelée barrière hémato-encéphalique (BHE).

Cette barrière est particulièrement limitante en ce qui concerne la biodistribution de macromolécules telles que les anticorps thérapeutiques, malgré leur contribution majeure aux progrès de santé publique. Depuis des décennies, des recherches sont menées pour faire face à ce challenge. Malgré leurs limites, les approches cliniques reposent notamment sur l'utilisation de voies d'administration invasives et directes, telles que l'injection intra-LCR (liquide céphalo-rachidien) de certaines molécules, en fonction de la balance bénéfice/risque pour le traitement de pathologies spécifiques. Les stratégies alternatives étudiées comprennent les méthodes physiques, comme l'utilisation des ultrasons, des méthodes chimiques reposant sur les modifications moléculaires, ainsi que les méthodes biopharmaceutiques visant à proposer des alternatives en termes de voies d'administration et/ou de développement galénique. Parmi les approches de biopharmacie disponibles, la voie nasale s'est présentée comme une alternative prometteuse pour contourner la BHE.

A ce jour, peu d'études tant *in vitro* qu'*in vivo* ont cherché à déterminer la biodistribution quantitative et qualitative des IgG thérapeutiques administrés par voie intranasale, ni à comparer des formulations d'IgG libres versus formulés dans un nanovecteur au niveau cérébral dans les conditions non pathologiques.

# OBJECTIFS ET DEMARCHES METHODOLOGIQUES

L'objectif de cette thèse est de développer une formulation d'anticorps thérapeutique qui, associée à une administration nasale, optimisera la biodisponibilité cérébrale d'un anticorps monoclonal dans le traitement des métastases cérébrales. Notre médicament modèle est le trastuzumab, indiqué dans le traitement des métastases cérébrales HER2-positives. Pour cela, nous avons opté pour des nanoparticules polymériques à base de PLGA, en réalisant dans un premier temps une preuve de concept en utilisant l'anticorps entier. L'objectif est donc de développer une formulation nasale de nanoparticules (NP) de PLGA chargées en TZB, afin d'évaluer son potentiel effet thérapeutique contre les métastases cérébrales du cancer du sein HER2-positif.

Pour atteindre cet objectif, nous avons procédé en quatre étapes :

**1) Étude de préformulation et essais de formulation de nanoparticules (NP) chargées d'anticorps**

Cette étape a consisté à élaborer un cahier des charges à partir d'une revue de la littérature, à sélectionner les différents excipients et leurs caractéristiques selon les données publiées, et à examiner les méthodes de formulation à tester. Nous avons ensuite évalué la stabilité du trastuzumab dans ces conditions de formulation, puis réalisé des tests sur plusieurs formulations. Les formulations ont été caractérisées physico-chimiquement et morphologiquement, et des méthodes de quantification ont été développées. Sur la base de ces caractéristiques, nous avons sélectionné une formulation candidate pour tester sa pertinence dans des modèles *in vitro*.

**2) Evaluation *in vitro* de passage à travers l'épithélium nasal**

Cette étape a consisté à soumettre les formulations candidates à des tests de perméabilité *in vitro*, en comparant le trastuzumab libre à celui formulé dans des nanoparticules de PLGA. Nous avons également évalué l'influence de la concentration et du nombre d'administrations sur le passage à travers l'épithélium nasal *in vitro*.

**3) Étude pharmacocinétique sur un modèle animal**

Cette dernière étape a consisté à évaluer, sur un modèle plus complet (modèle murin), la perméabilité de l'anticorps libre par rapport à celle de l'anticorps formulé dans des nanoparticules.

# RESULTATS DES TRAVAUX DE THESE

# I. DEVELOPPEMENT DE LA FORMULATION DE TRASTUZUMAB DANS LES NANOPARTICULES DE PLGA (ARTICLE)

## A. INTRODUCTION DE L'ETUDE

La première étape a consisté à élaborer les spécifications auxquelles la formulation destinée à l'administration nasale doit répondre, à partir des données disponibles dans la littérature. Comme indiqué dans l'introduction de ce travail, la voie d'administration du nez au cerveau se heurte à plusieurs obstacles physiologiques majeurs, notamment la présence de mucus nasal, la clairance mucociliaire, l'activité enzymatique locale, les contraintes anatomiques liées au volume restreint de la cavité nasale ainsi que la perméabilité limitée des épithéliums olfactif et respiratoire.

Dans ce contexte, l'administration N2B d'un anticorps thérapeutique représente un défi particulier, car les protéines sont intrinsèquement sensibles à la dégradation enzymatique et aux conditions physico-chimiques du milieu nasal. L'utilisation de nanoparticules polymériques PLGA retenues comme vecteur pour cette thèse, constitue une stratégie pour pallier ces limitations. Selon leur composition et leur fonctionnalisation de surface, ces vecteurs offrent plusieurs avantages complémentaires : ils protègent l'anticorps contre la dégradation enzymatique locale, contribuent à sa stabilisation au sein de la formulation et facilitent sa diffusion à travers le mucus nasal.

Au-delà de ces propriétés, les nanoparticules de PLGA peuvent favoriser l'absorption nasale par des mécanismes non spécifiques, sans nécessiter de fonctionnalisation de surface. En effet, contrairement aux anticorps monoclonaux qui sont hydrophiles, les nanoparticules de PLGA présentent des propriétés de surface comme l'hydrophobicité, qui favorisent les interactions avec les membranes lipidiques des cellules épithéliales [211,274]. Ces interactions facilitent l'adsorption à la surface cellulaire, suivie d'une internalisation par diverses voies d'endocytose [275], telles que l'endocytose dépendante de la clathrine ou de la cavéoline et la macropinocytose [211,276].

Par ailleurs, les nanoparticules peuvent être fonctionnalisées avec des agents muco-adhésifs (chitosane) afin de prolonger le temps de résidence au site d'absorption, ou avec des ligands de ciblage (transferrine, lactoferrine ou peptides dérivés de virus tels que RVG29) pour orienter spécifiquement la distribution vers le cerveau. Enfin, leur capacité à encapsuler d'importantes quantités de molécules actives et à moduler leur profil de libération fait d'elles des systèmes adaptés à la conception de systèmes à libération prolongée, intéressants pour les traitements au long cours.

Les principaux critères de qualité qui ont été retenus sont résumés dans le tableau 6. Ils ont été définis pour que la formulation finale (le véhicule et la molécule active) réponde à ces exigences à l'issue du développement pharmaceutique. Ces critères prennent en compte les propriétés physico-chimiques de la formulation, sa compatibilité avec la muqueuse nasale et les exigences nécessaires au ciblage cérébral par voie nasale.

L'objectif principal de cette thèse étant d'établir une preuve de concept, nous avons choisi d'aborder ces différents critères progressivement. Certains ont été pris en compte dès le début de cette étude, tandis que d'autres seront intégrés au fur et à mesure de l'avancement du développement galénique. Ils représentent donc les orientations futures de ce travail. L'objectif premier étant de démontrer la faisabilité de cette stratégie avant d'optimiser tous les paramètres de la formulation.

**Tableau 6 : cahier des charges des formulation pour l'administration nasale pour une application N2B**

| Paramètre | Critère cible |
|---|---|
| **Tolérance et sécurité** | |
| **Irritation nasale** | Absente Indispensable |
| **Toxicité locale muqueuse** | Minimale, absence de lésions |
| **Formulation** | |
| **Osmolarité** | 300 ± 20 mOsmol/L |
| **pH** | 4,5 – 6,5 |
| **Viscosité** | Compatible avec l'administration nasale et la rétention muqueuse |
| **Mucoadhésion / mucodiffusion** | Souhaitée |
| **Temps de résidence nasal** | Le plus long possible |
| **Stabilité et intégrité du TZB** | |
| **Stabilité de l'anticorps encapsulé** | Maintenue pendant le procédé de formulation et la libération |
| **Teneur en anticorps** | Compatible avec les études biologiques et la dose thérapeutique |
| **Cinétique de libération** | Libération prolongée |
| **Protection enzymatique** | Souhaitée (encapsulation protectrice) : |
| **Excipients protecteurs** | À évaluer selon les études de stabilité |
| **Nanoparticules** | |
| **Biodégradabilité / biocompatibilité** | Indispensable : approuvé FDA/EMA |
| **Taille** | < 200 nm |
| **Indice de polydispersité (PDI)** | < 0,20 Indispensable |
| **Potentiel zêta (ζ)** | Charge adaptée à la stratégie retenue : neutre/quasi-neutre pour une approche |

| | |
|---|---|
| | muco-pénétrante, ou chargé pour une approche mucoadhésive |
| **Efficacité d'encapsulation (EE)** | Maximal |
| **Reproductibilité du procédé** | Indispensable |
| **Dispositif** | |
| **Volume administré** | 25–100 µL par narine |
| **Dépôt olfactif** | Maximal (région postéro-supérieure) |
| **Taille des particules aérosolisées** | 10–150 µm (gouttelettes) |

Plusieurs méthodes de préparation peuvent être envisagées pour développer des nanosphères chargées en trastuzumab. Afin d'obtenir une efficacité d'encapsulation satisfaisante avec une méthode simple, reproductible et compatible avec les ressources disponibles au laboratoire, nous avons opté pour des nanoparticules de PLGA. Ce polymère biocompatible et biodégradable est approuvé par la FDA et l'EMA et permet de concevoir des systèmes à libération contrôlée.

La méthode de préparation choisie est la double émulsion évaporation du solvant. Comme mentionné dans l'introduction, cette technique soumet les protéines encapsulées à différents types de contrainte. Au cours du processus, l'anticorps est exposé à de multiples interfaces (air-liquide lors de l'agitation, eau-solvant organique, surfaces hydrophobes du matériel), ainsi qu'à des contraintes mécaniques générées par la sonication et l'échauffement qui en résulte. Tous ces facteurs sont susceptibles d'induire la dégradation de l'anticorps. De plus, la dégradation progressive du polymère entraîne la formation d'acides lactiques et glycoliques, provoquant une diminution locale du pH acide susceptible de compromettre la stabilité du TZB.

Avant de commencer le développement de la formulation, il nous a donc paru essentiel d'évaluer la stabilité du TZB et de son fragment Fab dans diverses conditions de stress susceptibles d'être rencontrées, de la fabrication à la libération du principe actif dans l'organisme. L'identification de ces stress a permis de définir les conditions des études de stabilité. Les paramètres étudiés étaient : le pH (6,1 et 7,4), la sonication (30 et 60 secondes), cinq cycles de congélation-décongélation et différentes températures de stockage (4 °C, 25 °C et 37 °C). La stabilité de l'anticorps a été suivie pendant 30 jours après l'application de chacun de ces stress, à l'aide de différents tests de caractérisation. Chaque condition a été systématiquement comparée à un témoin non soumis au stress. Cette étude avait deux objectifs : identifier les paramètres de formulation compatibles avec la stabilité de l'anticorps et évaluer la nécessité d'incorporer des excipients protecteurs au cours du procédé.

Les principaux mécanismes de dégradation des protéines comme la fragmentation et l'agrégation, ont été étudiés afin d'identifier les conditions de formulation les plus favorables au maintien de l'intégrité et de l'activité du TZB. À titre préventif, nous avons

entrepris de mettre plusieurs mesures en place pour limiter l'impact de ces contraintes, notamment une sonication séquentielle à basse température, ce qui a permis de réduire l'échauffement des échantillons et de minimiser la durée d'exposition aux contraintes.

Après avoir validé la stabilité du TZB lors du processus de formulation, plusieurs formulations de nanoparticules ont été développées en faisant varier différents paramètres. Les effets de la masse molaire (5O4H et 502H), du ratio lactide/glycolide de 50/50 ou 75/25 et de la concentration du polymère, de la nature et de la concentration du stabilisant, la proportion de chacune des phases inclues dans la formulation, de la présence de l'anticorps et de certaines étapes du procédé, telles que le lavage, ont été étudiés. L'objectif étant d'obtenir des nanoparticules d'une taille inférieure à 200 nm avec une distribution granulométrique étroite, de maximiser l'efficacité d'encapsulation (EE %) et la capacité de charge médicamenteuse ou taux de de chargement (DL %) (compte tenu du coût élevé du trastuzumab). Les nanoparticules obtenues ont ensuite été caractérisées afin d'évaluer l'influence de ces différents paramètres sur leurs propriétés physico-chimiques. L'objectif était d'identifier la formulation candidate répondant le mieux aux spécifications définies pour la délivrance cérébrale.

Les résultats obtenus de cette première phase de développement ont permis l'identification d'une première formulation candidate, et ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Pharmaceutics* (Kengne Kamkui et al., 2025) [170] (annexe 2). Les sections suivantes présentent des informations complémentaires notamment concernant certains aspects du matériel et des méthodes, un résumé synthétique de certains résultats ainsi que des résultats non détaillés dans la publication afin de présenter de façon plus complète le développement de la formulation.

# B. MATERIELS ET METHODES

Le trastuzumab (TZB) a été initialement produit et caractérisé dans notre laboratoire. Par la suite, la formulation commerciale Herceptin® a été fournie par le laboratoire ICMUB.

Tous les lots de TZB produits ont été caractérisés par différentes techniques afin d'évaluer leur qualité et leur stabilité. Les analyses comprenaient l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), la diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour la détermination du rayon hydrodynamique, la mesure de la concentration par spectrophotométrie UV-visible à 280 nm, la détermination de la température d'inflexion (courbe de dénaturation thermique) et l'évaluation de la fonctionnalité par cytométrie en flux. Ces paramètres ont ensuite été suivis au cours du temps afin d'évaluer la stabilité du TZB dans différentes conditions expérimentales, avec et sans stress.

Les mêmes caractérisations ont également été réalisées sur le fragment Fab du trastuzumab (Fab-TZB), fourni par le laboratoire CGFL de Dijon. Enfin, les formes libérées de TZB et de Fab-TZB après leur encapsulation dans des nanoparticules ont également été analysées afin de vérifier la conservation de leurs propriétés physico-chimiques et fonctionnelles.

## B.1 Production et purification trastuzumab

Le trastuzumab (TZB) a été produit au laboratoire à partir de cellules ExpiCHO™ (Thermo Fisher Scientific), selon le protocole recommandé par le fournisseur. Après purification sur une colonne d'affinité protéine A (HiTrap Protein A HP, GE Healthcare), l'anticorps a été élué dans un tampon citrate (50 mM, pH 4,0), immédiatement neutralisé avec un tampon Tris-HCl (1 M, pH 9), puis dialysé contre du PBS.

## B.2 Caractérisation de la production et étude de stabilité, et de la stabilité après la libération des nanoparticules

**SDS-PAGE**

La SDS-PAGE permet de vérifier le poids moléculaire apparent des protéines et de détecter toute irrégularité de taille. Des gels préfabriqués commercialisés, Mini-PROTEAN TGX 4–15 % (Bio-Rad, réf. 4561083), ont été utilisés. Les échantillons ont été mélangés à un tampon de chargement non réducteur (Bio-Rad, réf. 1610738) ou un tampon de Laemmli réducteur 4× (Bio-Rad, réf. 1610747) contenant du β-

mercaptoéthanol, puis dénaturés à 94 °C pendant 10 minutes. La migration électrophorétique a été réalisée à tension constante (130 V) pendant 30 minutes. La masse moléculaire des protéines a été estimée à l'aide du marqueur precision plus protein™ (Bio-Rad, réf. 1610363). Après migration, les gels ont été colorés au bleu de Coomassie pendant une heure, rincés à l'eau, puis imagés à l'aide d'un système Gel Doc EZ (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, États-Unis). Les images ont ensuite été analysées avec le logiciel Image Lab.

**DLS**

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique utilisée pour déterminer la taille des particules en suspension à partir des fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée, induites par leur mouvement brownien. La DLS a permis de déterminer le diamètre ou le rayon hydrodynamique (Rh), ainsi que l'indice de polydispersité (PDI) des particules à l'aide d'un instrument DynaPro NanoStar (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) équipé du logiciel Dynamics version 7.1.0. Le PDI, dérivé de l'analyse de la distribution de la taille des particules, a été utilisé pour évaluer l'homogénéité de la taille des particules.

**Analyse de la structure secondaire**

La stabilité conformationnelle des protéines a été évaluée à l'aide de courbes de dénaturation thermique obtenues avec le Tycho NT.6 (NanoTemper Technologies, Allemagne). Cette technique repose sur la mesure de la fluorescence intrinsèque des résidus aromatiques, principalement le tryptophane et la tyrosine, à 330 et 350 nm lors d'une augmentation contrôlée de la température. Les variations du ratio de fluorescence sont spécifiques à chaque protéine et permettent de générer un profil de dénaturation thermique et de déterminer les températures d'inflexion (Ti), correspondant aux principales transitions conformationnelles (repliement) de la protéine.

**Étude de la fonctionnalité par cytométrie en flux**

La fonctionnalité du trastuzumab et du fragment Fab-TZB a été évaluée par cytométrie en flux, en fonction de leur capacité à se lier au récepteur HER2 exprimé à la surface des cellules BT-474 (ATCC, États-Unis). Les cellules ont été cultivées dans un milieu Hybri-Care (ATCC, réf. 46-X) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco), conformément aux recommandations du fabricant.

Les cellules ont été récoltées à environ 85 % de confluence à l'aide d'une solution de Versene (PBS-EDTA 0,05 %), puis lavées avec du PBS et remises en suspension dans un tampon de saturation composé de PBS, de 0,5 % de BSA et de 5 % de sérum de chèvre normal (SCN). Les cellules ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4 °C avec différentes concentrations de TZB ou de Fab-TZB. Après plusieurs lavages au PBS, un anticorps secondaire conjugué à l'Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen) dirigé contre l'IgG1

humaine pour le TZB et la chaîne kappa humaine pour le Fab-TZB a été ajouté et incubé à 4 °C pendant 3 heures.

Après les derniers lavages, l'intensité de fluorescence de 10 000 cellules a été mesurée par cytométrie en flux à l'aide d'un cytomètre FACSCalibur (BD Biosciences) pour TZB ou d'un cytomètre Attune NxT (Invitrogen) pour Fab-TZB. Les intensités moyennes de fluorescence (MFI) ont permis d'établir les courbes de liaison et de déterminer la constante de dissociation apparente (Kd) à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software).

## B.3 Dosage de TZB par ELISA

Un kit ELISA a été développé au laboratoire pour quantifier le trastuzumab à l'aide d'un dosage ELISA en sandwich. Des plaques de 96 puits à haute capacité d'adhésion (MaxiSorp™, Thermo Fisher Scientific, réf. 439454) ont été coatées avec 150 µL/puits d'un anticorps de capture (anticorps polyclonal goat anti-human kappa, SouthernBiotech, réf. 206001) à une concentration de 5 µg/mL dans un tampon phosphate 0,05 M (pH 7,4). Les plaques ont été incubées une nuit à température ambiante. Après incubation, les plaques ont été vidées puis saturées avec 300 µL/puits d'un tampon de saturation composé de tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4), de NaCl 0,15 M, de BSA à 0,1 % et d'EDTA 1 mM. Elles ont ensuite été incubées pendant au moins 24 heures à 4 °C avant utilisation. Les plaques saturées ont été lavées trois fois avec un tampon de lavage constitué de PBS et du Tween 20 à 0,05 %. Les échantillons, préalablement dilués ou préparés dans le tampon de dosage, ont ensuite été distribués à 100 µL/puits et incubés toute la nuit à 4 °C. Après trois lavages, 100 µL/puits de l'anticorps de détection (anticorps monoclonal mouse anti-human IgG1 kappa conjugué à la peroxydase de raifort (HRP), SouthernBiotech, réf. 9230-05), dilué au 1/50 000 dans le tampon de dosage, ont été ajoutés dans chaque puits. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 4 heures à température ambiante. Après trois nouveaux lavages, 200 µL/puits de substrat chromogène TMB ONE (Kementec, réf. 4380A) ont été ajoutés. Les plaques ont été incubées pendant 30 min à température ambiante, à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique a ensuite été arrêtée par l'ajout de 50 µL/puits d'une solution de HCl 1 M. Enfin, l'absorbance a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques SpectraMax™.

## B.4 Préparation des nanoparticules

Des nanoparticules de trastuzumab (NP-TZB) ont été préparées par une méthode de double émulsion eau/huile/eau (E1/H/E2) (figure 21), suivie d'une évaporation du

solvant, adaptée de la littérature [277]. Une phase aqueuse interne contenant 1 mg de trastuzumab (TZB) dans du PBS (pH 7,4) et 2,5 % de poloxamère 188 (P188 ; Kolliphor®, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, États-Unis) a été dispersée par émulsification dans une solution de PLGA à 100 mg/mL (Resomer® RG 504 H, rapport LA/GA 50:50, masse moléculaire 38–54 kDa ; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Allemagne) dissoute dans de l'acétate d'éthyle, avec un rapport volumique phase organique/phase aqueuse de 3:2. Le P188 a été ajouté à la phase aqueuse interne afin de limiter l'adsorption du TZB aux interfaces générées lors de la sonication et de préserver sa stabilité au cours de cette étape. L'émulsion primaire a été obtenue par sonication à l'aide d'un homogénéisateur ultrasonique Vibra-Cell™ (Sonics®, Newtown, CT, États-Unis) à une amplitude de 60 % pendant 30 s dans la glace. Cette émulsion primaire a ensuite été dispersée dans une solution aqueuse de poly (alcool vinylique) (PVA) à 2 % (30–70 kDa), utilisée comme stabilisant, à un ratio volumique de 2:1. Cette seconde émulsion a été homogénéisée par sonication pendant 1 min dans les mêmes conditions. Elle a ensuite été diluée dans 10 mL de solution de PVA à 2 % et maintenue sous agitation magnétique pendant 4 h sous une hotte aspirante pour permettre l'évaporation de l'acétate d'éthyle et la formation des nanoparticules.

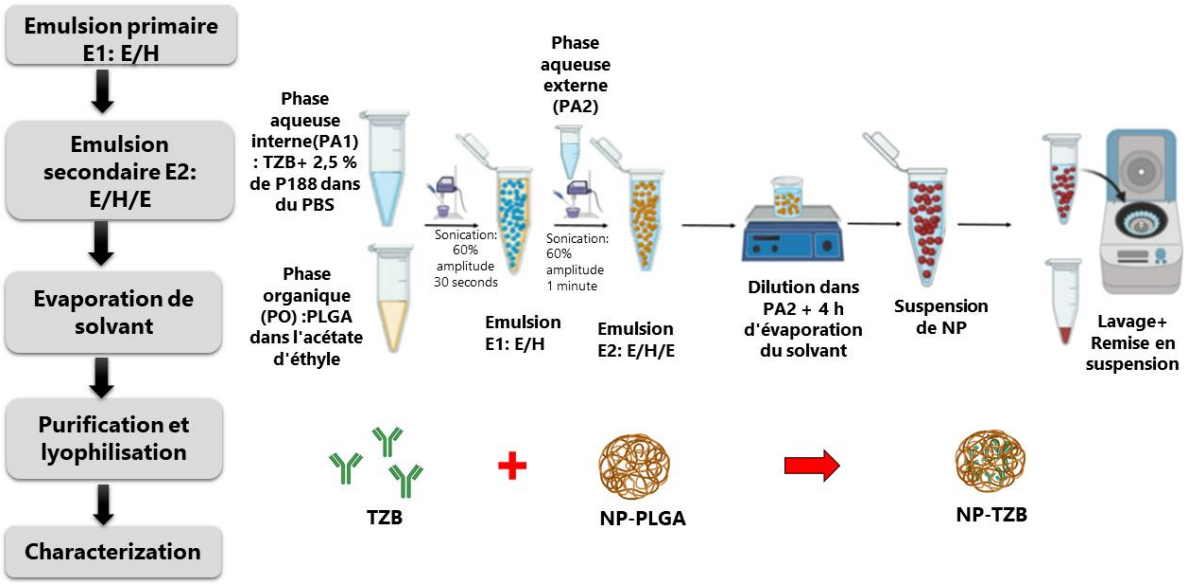



**Figure 21 : Étapes de préparation de nanoparticules de PLGA chargées en trastuzumab (NP-TZB) par la méthode d'évaporation de solvant à double émulsion.** (Créée avec bioRender)

La suspension de NP a ensuite été récupérée par centrifugation à 20 000 × g pendant 35 min, puis soumise à trois cycles de lavage de 20 min dans de l'eau ultrapure Milli-Q. Après chaque centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot de nanoparticules a été remis en suspension dans de l'eau ultrapure milli-Q.

Cette étape de purification ou de lavage a pour but d'éliminer l'excédent de stabilisant libre et d'éliminer le TZB non fixé ou chargé dans la nanoparticule. L'efficacité du protocole de lavage a été déterminée en quantifiant le TZB par ELISA et BCA dans les

trois surnageants de lavage obtenus après remise en suspension successive du culot de nanoparticules dans 10 mL d'eau Milli-Q. Comme le montre la figure 22, la quasi-totalité du TZB est éliminée lors du premier lavage (dans les 3 lots de formulations), tandis que les deuxième et troisièmes lavages contiennent des quantités très faibles ou indétectables. Ces résultats indiquent que trois cycles de lavage suffisent pour éliminer le TZB libre avant l'analyse des nanoparticules.

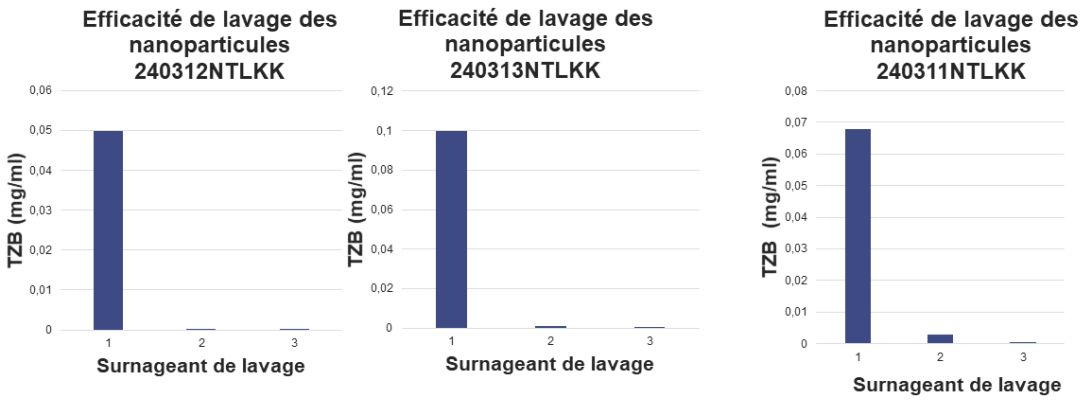



**Figure 22**: **Validation de l'efficacité du protocole de lavage pour les nanoparticules de PLGA chargées en trastuzumab.** Concentration de trastuzumab (TZB) libre mesurée par ELISA dans les trois surnageants de lavage successifs des formulations 240312NTLKK, 240313NTLKK et 240416NTLKK11. Après chaque lavage, le culot de nanoparticules a été remis en suspension dans 10 mL d'eau Milli-Q puis centrifugé avant la récupération du surnageant.

Les nanoparticules ont ensuite été lyophilisées (FreeZone Triad, Labconco, Kansas City, MO, États-Unis) et conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Des nanoparticules non chargées (NP blanches) ont été préparées selon le même protocole, sans trastuzumab.

## B.5 Caractérisation physicochimiques des nanoparticules

### B.5.1 Mesure de la taille, indice de polydispersité, potentiel zêta et morphologie

Le rayon hydrodynamique et l'indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules ont été déterminés par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Le potentiel zêta a été mesuré par mobilité électrophorétique à l'aide d'un zêta potential analyser Wallis (Cordouan Technologies, Pessac, France). Les mesures ont été réalisées en triplicat à 25 °C sur des nanoparticules fraîchement préparées ou après lyophilisation. Les échantillons ont été remis en suspension dans du PBS, puis dilués dans de l'eau ultrapure Milli-Q avant analyse. La morphologie des nanoparticules a été évaluée par microscopie électronique à transmission (TEM). Les échantillons ont été déposés sur une grille de cuivre, contrastés à l'acétate d'uranyle, puis observés à l'aide d'un microscope électronique JEOL JEM-1400 (JEOL Ltd., Tokyo, Japon).

### B.5.2 Evaluation de l'efficacité d'encapsulation (EE%) et de la capacité de chargement DL% en trastuzumab des formulations

L'efficacité d'encapsulation EE% et la capacité de chargement DL% sont deux paramètres essentiels pour évaluer les performances des nanoparticules formulées. L'EE% est le rendement d'encapsulation qui renseigne sur la proportion de TZB encapsulée par rapport à la quantité introduite initialement dans la formulation. Le DL% est la teneur en TZB dans les nanoparticules correspondant à la quantité de TZB contenue dans les nanoparticules par rapport à leur masse totale. Parmi les approches décrites dans la littérature, l'EE% a été déterminé par la méthode indirecte, tandis que le DL% a été déterminé par la méthode directe (figure 23).

**Détermination de l'EE %** : la suspension de nanoparticules fraîchement préparée issue de l'évaporation du solvant a été centrifugée à 20 000 × g pendant 50 min afin de séparer les nanoparticules du trastuzumab non encapsulé. La concentration en TZB libre dans le surnageant a ensuite été déterminée à l'aide d'un dosage à l'acide bicinchoninique (BCA) (Thermo Fisher Scientific, réf. 10678484, Rockford, IL, États-Unis), conformément au protocole du fabricant. Le taux d'encapsulation a été calculé à partir de la différence entre la quantité initiale de TZB ajoutée à la formulation et la quantité de TZB libre mesurée dans le surnageant, en utilisant l'équation suivante :

EE%= (quantité de TZB introduite − quantité de TZB dans le surnageant) / (quantité introduite TZB) ×100

**Déterminer le DL %** : une suspension de 10 mg/mL de nanoparticule lyophilisée dans une solution de NaOH 0,1 M contenant 0,5 % SDS est incubée sous agitation continue pendant au moins 1 heure à 37 °C, afin de lyser le PLGA et de libérer le TZB encapsulé. Après neutralisation avec du HCl 1 M, les échantillons ont été centrifugés à 20 000 × g pendant 30 min. Le TZB libéré dans le surnageant a ensuite été déterminée par un dosage BCA comme décrit précédemment. La capacité de charge a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

DL% = (Quantité de TZB libérée après hydrolyse) / (masse des nanoparticules lysées) ×100

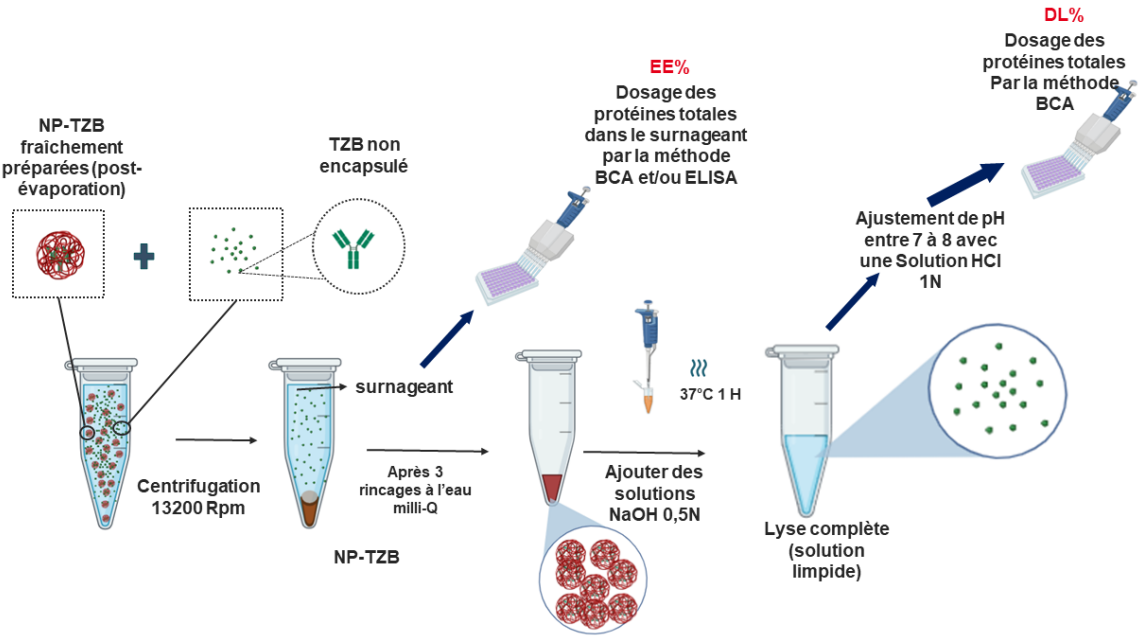



**Figure 23 : Protocole de détermination de l'efficacité d'encapsulation (EE %) et de la capacité de chargement (DL %) du trastuzumab dans des nanoparticules de PLGA.** (Créée avec BioRender)

### B.5.3 Évaluation de la cinétique de libération du TZB à partir de nanoparticules (NP) dans un tampon PBS, du mucus nasal ou du plasma

Une suspension de nanoparticules à 10 mg/mL (1 mL), préparée à partir du lyophilisat dans le milieu de libération PBS pH 7,4, mucus nasal artificiel (BZ253 ; Biochemazone, Alberta, Canada) ou du plasma de rat), a été incubée à 37 °C sous agitation constante (1 000 tr/min) pendant 232 h. À des temps prédéterminés, la suspension a été centrifugée à 20 000 × g (RCF) pendant 20 min à température ambiante afin de séparer le culot de nanoparticules du surnageant. Un volume de 100 µL de surnageant a été prélevé et remplacé par un volume équivalent de milieu de libération frais correspondant à la condition étudiée. Le culot de nanoparticules a ensuite été remis en suspension avant d'être réincubé dans les mêmes conditions. Les échantillons de surnageant ont été congelés pour une quantification ultérieure de TZB libéré par dosage ELISA.

# C. RESULTATS

## C.1 Etude de stabilité

Avant le développement de la formulation, la stabilité du TZB a été évaluée afin de déterminer sa résistance aux principales contraintes susceptibles d'être rencontrées lors de la préparation, du stockage et du transport. Les études ont porté sur la sonication (30 et 60 s), les cycles de congélation-décongélation, un pH de 6,1 ainsi que le stockage à 4, 25 et 37 °C. L'incidence de ces conditions sur la structure, l'état d'agrégation et la fonctionnalité de l'anticorps a été évaluée.

### C.1.1 Stabilité structurale

Les figures 24a et 24d présentent les **profils électrophorétiques** du TZB dans des conditions dénaturantes et non dénaturantes. Dans toutes les conditions étudiées, les profils de migration sont identiques à ceux du témoin. Les deux bandes correspondant aux chaînes lourde (~50 kDa) et légère (~25 kDa) sont observées sans apparition de bandes supplémentaires, ce qui suggère l'absence de fragmentation de l'anticorps.

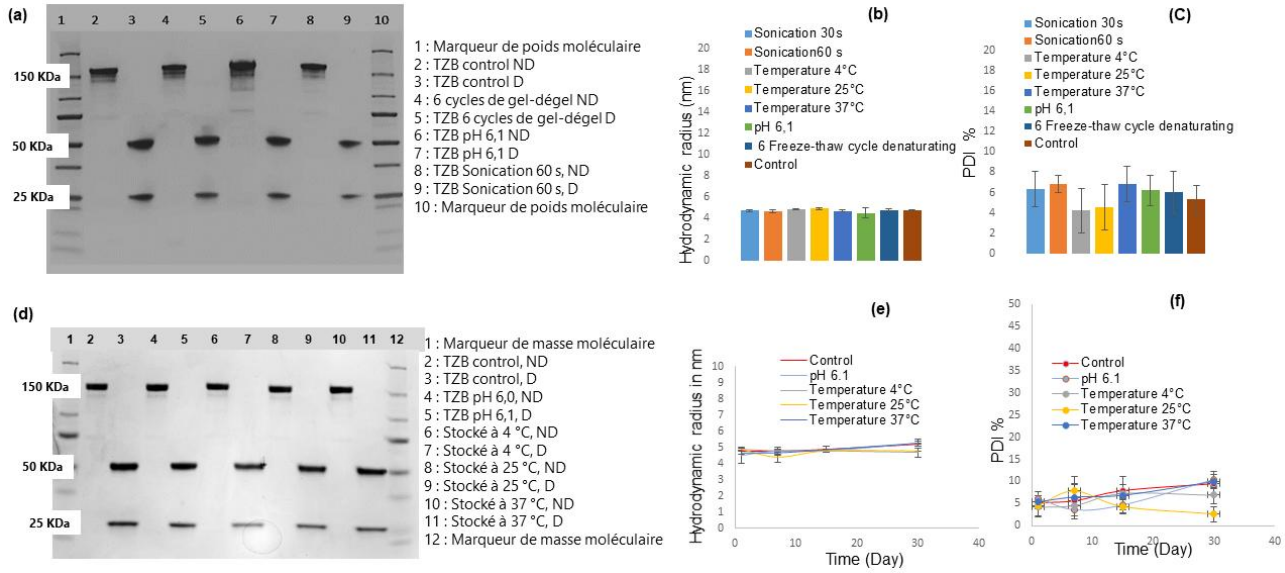
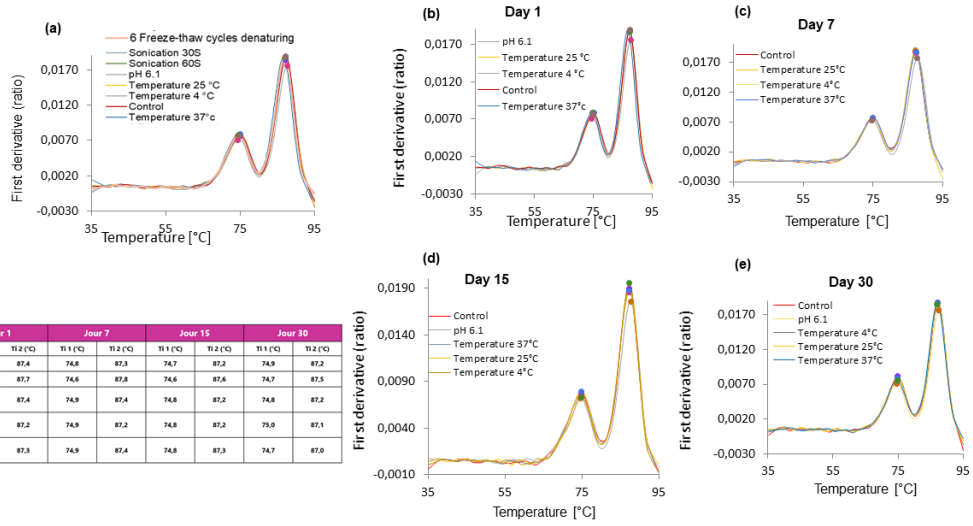



**Figure 24** : **Évaluation de l'intégrité structurale et colloïdale du trastuzumab dans diverses conditions de stress.** (a) Influence du stress appliqué sur le profil électrophorétique (SDS-PAGE) en conditions non dénaturante (ND) et dénaturante (D). (b) Rayon hydrodynamique et (c) indice de polydispersité (PDI) mesurés par diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour chaque condition de stress au jour 1. (d) Profil SDS-PAGE du TZB conservé à pH 6,1 et à différentes températures (4, 25 et 37 °C) pendant 30 jours, dans des conditions ND et D. (e) Évolution du rayon hydrodynamique et (f) du PDI au cours du temps (jours 0 à 30) pour les conditions de conservation à pH 6,1 et à des températures de 4, 25 et 37 °C. L'échantillon était constitué de TZB à une concentration de 1 mg/mL dans un tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) à pH 7,4. Les données ont été analysées à l'aide d'Excel 2019 et exprimées sous forme de moyenne ± écart-type (n=3).

Le **rayon hydrodynamique** est resté compris entre 4 et 5 nm et l'indice de polydispersité (PDI) est demeuré inférieur à 10 % dans toutes les conditions, sans différence significative par rapport au témoin (figures 24b et 24c). Aucune variation de ces paramètres n'a été observée au cours de la période de suivi de 30 jours, quels que soient le pH ou la température de stockage (figures 24e et 24f). Ces résultats indiquent l'absence d'agrégation détectable de la TZB.

Les **profils de dénaturation thermique** obtenus par fluorescence intrinsèque ont révélé deux températures de transition, situées aux alentours de 75 °C et 87 °C, correspondant respectivement aux domaines CH2 pour la première et aux domaines Fab et/ou CH3 du TZB pour la seconde [278]. Aucune modification significative de ces températures n'a été observée dans les différentes conditions de stress ni au cours de la période de suivi de 30 jours (Figure 25).




| Condition | Jour 1 | | Jour 7 | | Jour 15 | | Jour 30 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tl 1 (°C) | Tl 2 (°C) | Tl 1 (°C) | Tl 2 (°C) | Tl 1 (°C) | Tl 2 (°C) | Tl 1 (°C) | Tl 2 (°C) |
| Contrôle | 74,9 | 87,4 | 74,8 | 87,3 | 74,7 | 87,2 | 74,9 | 87,2 |
| pH 6,1 | 74,3 | 87,7 | 74,6 | 87,8 | 74,6 | 87,6 | 74,7 | 87,5 |
| Température 4 °C | 74,7 | 87,4 | 74,9 | 87,4 | 74,8 | 87,2 | 74,8 | 87,2 |
| Température 25 °C | 75,1 | 87,2 | 74,9 | 87,2 | 74,8 | 87,2 | 75,0 | 87,1 |
| Température 37 °C | 75,0 | 87,3 | 74,9 | 87,4 | 74,8 | 87,3 | 74,7 | 87,0 |

**Figure 25: Évaluation de la structure secondaire du trastuzumab par fluorimétrie**. Profils de dénaturation thermique du TZB, exprimés sous forme de dérivée première du ratio de fluorescence intrinsèque (350/330 nm) en fonction de la température. (a) Comparaison de diverses conditions de stress à court terme (sonication de 30 s et 60 s, six cycles de congélation-décongélation, pH 6,1, températures de 4, 25 et 37 °C) par rapport au contrôle. Suivi des profils aux jours (b) 1, (c) 7 (d) 15 et (e) 30 pour des conditions de stockage à pH 6,1 et des températures de 4, 25 et 37 °C. Les deux températures d'inflexion caractéristiques (Tm1 ≈ 75 °C et Tm2 ≈87 °C).

### C.1.2 Stabilité Fonctionnelle

La fonctionnalité du TZB a été évaluée par cytométrie en flux à partir de la constante de dissociation apparente (Kd) et la capacité de liaison maximale (Bmax). Aucune modification significative de ces paramètres n'a été observée après sonication, cycles de congélation-décongélation ou exposition à un pH de 6,1 au jour 1 (Figure 26). Au cours du stockage, les valeurs de Kd sont restées stables jusqu'au jour 15 dans toutes les conditions. Au jour 30, une augmentation progressive de la Kd a été observée ; celle-ci était plus marquée à 37 °C (passant de 0,46 à 4,07 nM) et, dans une moindre

mesure, à pH 6,1 (1,59 nM). Malgré cette augmentation, les valeurs sont demeurées dans la plage nanomolaire. En conclusion, aucune altération majeure de la structure, de l'état d'agrégation ou de la fonctionnalité du TZB n'a été observée dans les conditions étudiées.

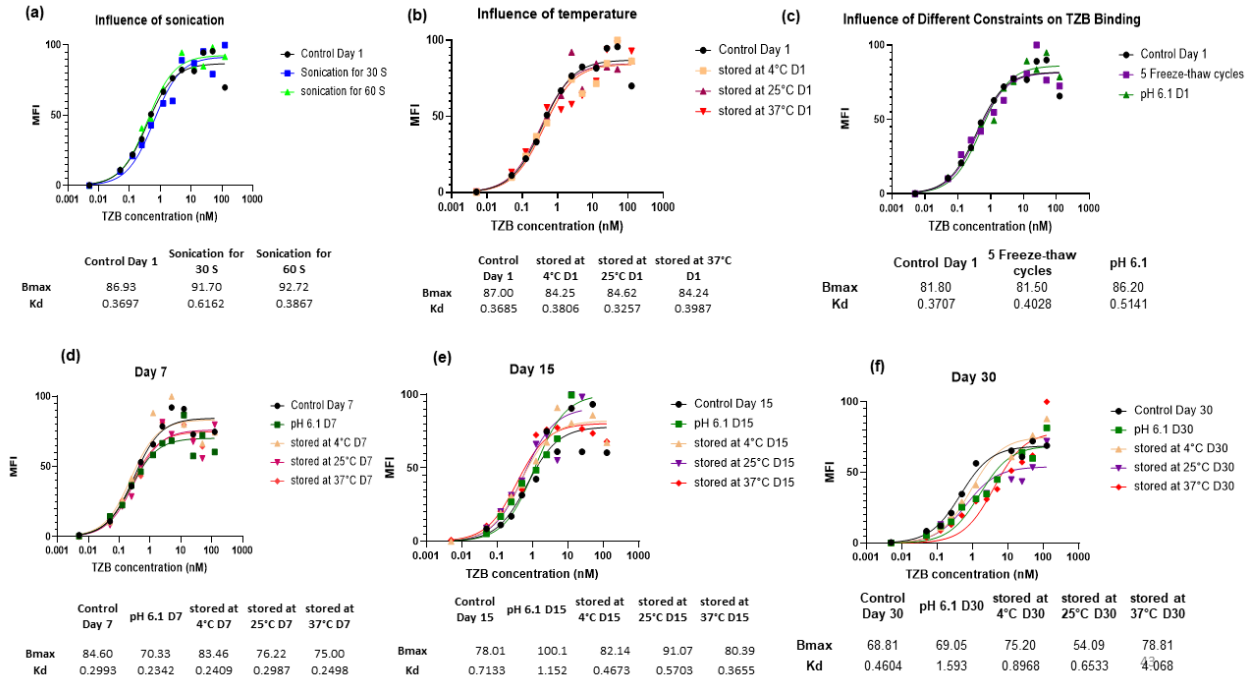



**Figure 26 : Évaluation de la fonctionnalité du trastuzumab par cytométrie en flux sur 30 jours**. Courbes de liaison du TZB à son récepteur HER2 sur les cellules BT474, exprimées en MFI en fonction de la concentration en TZB (nM), avec les paramètres de liaison Bmax et Kd déterminés par modélisation non linéaire. (a) Influence de la sonication (30 s et 60 s) sur la liaison du TZB au jour 1. (b) Influence de la température de conservation (4, 25 et 37 °C) au jour 1. (c) Influence des cycles de congélation-décongélation (n = 5) et d'un pH de 6,1 sur la liaison du TZB au jour 1. Suivi de la fonctionnalité aux jours (d) 7, (e) 15 et (f) 30 pour des conditions de conservation à pH 6,1 et à des températures de 4, 25 et 37 °C. Les valeurs de Kd et Bmax figurent dans les tableaux accompagnant chaque courbe. Abréviations : Kd, constante de dissociation apparente ; MFI, intensité de fluorescence moyenne.

## C.2 Formulation des Nanoparticules

Sur la base des données bibliographiques, la méthode d'évaporation de double émulsion évaporation de solvant a été retenue pour l'encapsulation du trastuzumab dans des nanoparticules de PLGA. Cette technique, couramment utilisée pour l'encapsulation de macromolécules hydrophiles, a été choisie pour sa capacité à produire des nanoparticules de taille uniforme avec une efficacité d'encapsulation élevée. Compte tenu de la quantité limitée et du coût élevé du TZB, les étapes initiales du développement ont été réalisées avec des nanoparticules vides « blanche » afin d'optimiser les paramètres clés de formulation avant de les appliquer aux

nanoparticules chargées en anticorps. L'influence de l'encapsulation du TZB a ensuite été évalué sur les formulations sélectionnées.

Le développement de la formulation a consisté à l'étude de l'influence de plusieurs paramètres susceptibles de modifier les propriétés physico-chimiques des nanoparticules. Les paramètres évalués concernaient le polymère (grade ou masse molaire et la concentration), le procédé de formulation (ratio volumique des différentes phases), le stabilisant de la phase aqueuse externe ainsi que des étapes spécifiques du procédé, notamment le lavage. Leur influence a été évalué en termes de taille des nanoparticules, d'indice de polydispersité (PDI), de stabilité colloïdale et pour certaines formulations, d'efficacité d'encapsulation (EE %), de taux de chargement en principe actif (DL %) et, de profil de libération du TZB.

Pour limiter le nombre de paramètres étudiés simultanément, certaines conditions ont été fixées au début de l'étude sur la base des résultats issus de la littérature. Parmi ces paramètres fixés au préalable, on retrouve la durée de sonication à 30 s pour la première émulsion (E1) et à 60 s pour la seconde (E2), avec une amplitude de 60 %, le ratio volumique de la phase organique sur la phase aqueuse interne (2 :1). La première émulsion a été stabilisée par du Poloxamer 188 (2,5 %), un tensioactif non ionique utilisé pour limiter les interactions du TZB avec les interfaces eau/solvant organique et air/liquide générées lors de la sonication, afin de réduire le risque de dénaturation de l'anticorps.

Le développement de la formulation a été réalisé progressivement. Dans un premier temps, l'influence du stabilisant dans la phase aqueuse externe a été étudiée. Les paramètres liés au polymère et au procédé de fabrication ont ensuite été évalués à l'aide de nanoparticules vides, avant d'être appliqués à des nanoparticules chargées en trastuzumab. Enfin, l'influence de la présence et la quantité de TZB incorporée dans la formulation a été examinée afin d'évaluer et d'améliorer l'efficacité d'encapsulation.

### C.2.1 Influence du type de stabilisant

Le choix du stabilisant pour la phase aqueuse externe est un paramètre de formulation important, car il influence la stabilité de l'émulsion et les caractéristiques des nanoparticules obtenues. Le cholate de sodium, un sel biliaire amphiphile d'origine naturelle, a été évalué comme stabilisant pour la phase aqueuse externe. Ce choix reposait sur sa biocompatibilité et ses propriétés de promoteur d'absorption des molécules, décrites dans la littérature susceptible de favoriser l'administration nasale.

Trois concentrations de cholate de sodium (0,25 %, 1 % et 2 %) ont été évaluées avec une concentration fixe de PLGA de 12 mg/mL. Quelle que soit la concentration étudiée, les analyses par DLS effectuées après purification ont révélé une distribution bimodale de la taille des nanoparticules, comprenant une population de particules d'un rayon inférieur à 100 nm et une population majoritaire d'un rayon supérieur à 200 nm (Figures

27a–c). Lors de la purification, le culot était difficile à remettre en suspension, ce qui suggérait la formation d'agrégats. Cette observation a été confirmée par microscopie électronique en transmission (MET), qui a révélé de nombreux agrégats de nanoparticules après le lavage (Figures 27d-e).

Ces résultats montrent que le cholate de sodium ne permet pas d'obtenir une suspension colloïdale suffisamment stable dans les conditions étudiées. Il n'a donc pas été retenu pour la suite du développement.

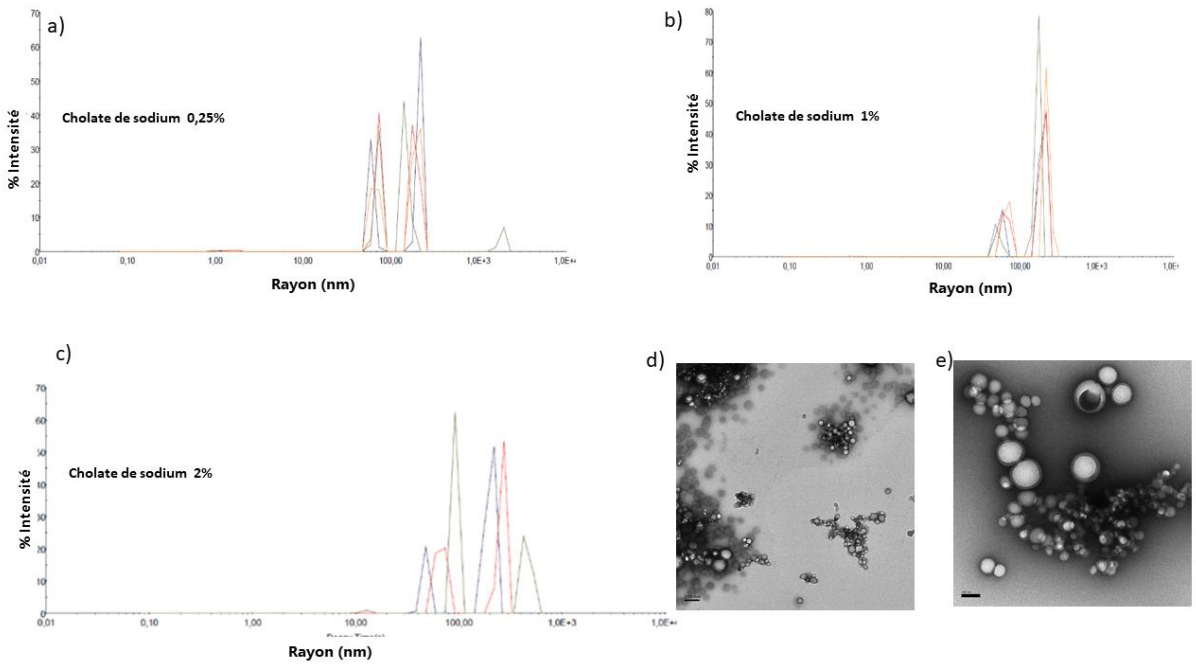



**Figure 27 : Caractérisation de nanoparticules de PLGA stabilisées au cholate de sodium**. Distribution de taille (par DLS) des nanoparticules obtenues à différentes concentrations de cholate de sodium : (a) 0,25 %, (b) 1 % et (c) 2 % (concentration de PLGA fixée à 12 mg/Ml, PO/PA1 à 10 :1 ; TZB 2 mg/ml). Imagerie par MET après purification montrant (d) des agrégats de nanoparticules et (e) des particules sphériques isolées de plus grande taille.

Afin de comparer le cholate de sodium aux deux stabilisants les plus couramment utilisés pour la préparation de nanoparticules de PLGA, une seconde série d'expériences a été réalisée en utilisant du PVA et du Poloxamer 188 (P188). Les premiers essais avec le cholate de sodium (Figure 27) ont été réalisés en utilisant une faible concentration de PLGA (12 mg/mL) en présence de trastuzumab. Dans ces conditions, il était difficile d'évaluer spécifiquement l'effet du stabilisant. Une seconde série d'expériences a donc été menée sur des nanoparticules vides, en utilisant une concentration fixe de PLGA de 100 mg/mL. Deux ratios volumiques PO/PA1 (3:2 et 10:1) ont été comparés, et les trois stabilisants ont été évalués à une concentration de 2 % (formulations 230426NTLKK01 à 230426NTLKK06).

Les résultats (Figure 28) montrent que le PVA à 2 %, associée à un ratio PO/PA1 de 3:2, a permis d'obtenir les nanoparticules les plus homogènes et reproductibles, avec un rayon hydrodynamique de 104 ± 3 nm et un PDI de 9 ± 2 %. Les formulations stabilisées avec le P188 présentaient des tailles comparables, allant de 90 ± 8 nm à 119 ± 16 nm, mais affichaient une plus grande variabilité entre les réplicats, en particulier pour le rapport 3:2. Bien que la formulation contenant du P188 à 2 % avec un ratio PO/PA1 de 10:1 ait présenté le plus faible rayon hydrodynamique (90 ± 8 nm ; PDI = 11 ± 2 %), elle n'a pas été retenue. En effet, la formation d'agrégats ou de précipités lors des étapes de centrifugation et de lavage rendait la remise en suspension difficile et non homogène. Ces agrégats, éliminés lors de la purification, ne sont pas pris en compte par la DLS, qui ne mesure que les nanoparticules restant en suspension. Enfin, le cholate de sodium a conduit aux rayons hydrodynamiques les plus élevés (123 ± 3 nm et 134 ± 10 nm), quel que soit le ratio volumique testé, confirmant ainsi qu'il n'est pas adapté à cette formulation. Les valeurs de PDI sont restées comparables pour les trois agents stabilisants (9 à 11 %). Au vu de ces résultats, la combinaison de PVA à 2 % et d'un rapport PO/PA1 de 3:2 a été retenue pour la suite, car elle offrait le meilleur compromis entre une taille de particule réduite, une bonne homogénéité, une stabilité colloïdale satisfaisante et une bonne reproductibilité.

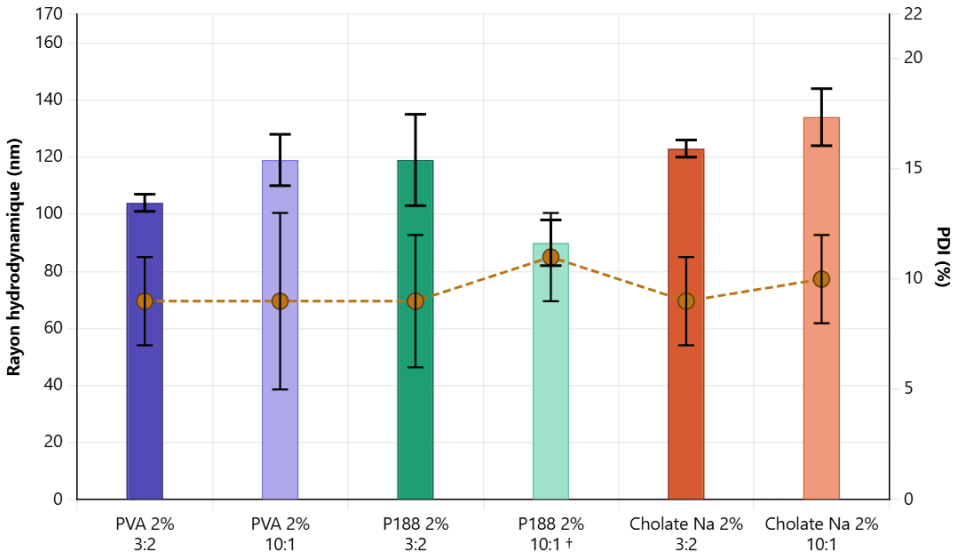



**Figure 28 : Influence du type de stabilisant et du rapport volumique PO/PA1 sur le rayon hydrodynamique moyen et l'indice de polydispersité (PDI).** Rayon hydrodynamique moyen (barres, axe de gauche) et PDI (ligne pointillée, axe de droite) de nanoparticules de PLGA 504H (100 mg/mL) stabilisées par du PVA à 2 %, du Poloxamer 188 (P188) à 2 % ou du cholate de sodium à 2 %, pour deux rapports volumiques PO/PA1 (3:2 et 10:1). Le rapport PA2/E1 a été maintenu constant à 2:1 pour toutes les formulations. Nanoparticules vides (sans TZB). Barres d'erreur = écart-type (n = 3). † Formation d'agrégats ou de précipités observée visuellement lors de l'étape de purification et non détectable par DLS en raison de l'absence de suspension colloïdale homogène. Codes de formulation : 230426NTLKK01–06. PO : phase organique (acétate d'éthyle contenant le PLGA) · PA1 : phase aqueuse interne (phase dispersée de la première émulsion) · PA2 : phase aqueuse externe (phase continue de la seconde émulsion, contenant le stabilisant) · E1 : émulsion primaire eau-dans-huile (E/H).

### C.2.2 Influence d'autres facteurs

L'objectif de cette étape était d'identifier les conditions de formulation permettant d'obtenir des nanoparticules de petite taille tout en maximisant l'efficacité d'encapsulation. Dans un premier temps, les paramètres clés de formulation ont été étudiés à l'aide de nanoparticules vides afin de sélectionner les conditions les plus favorables. Leur influence sur les caractéristiques des nanoparticules chargées en trastuzumab a ensuite été évaluée.

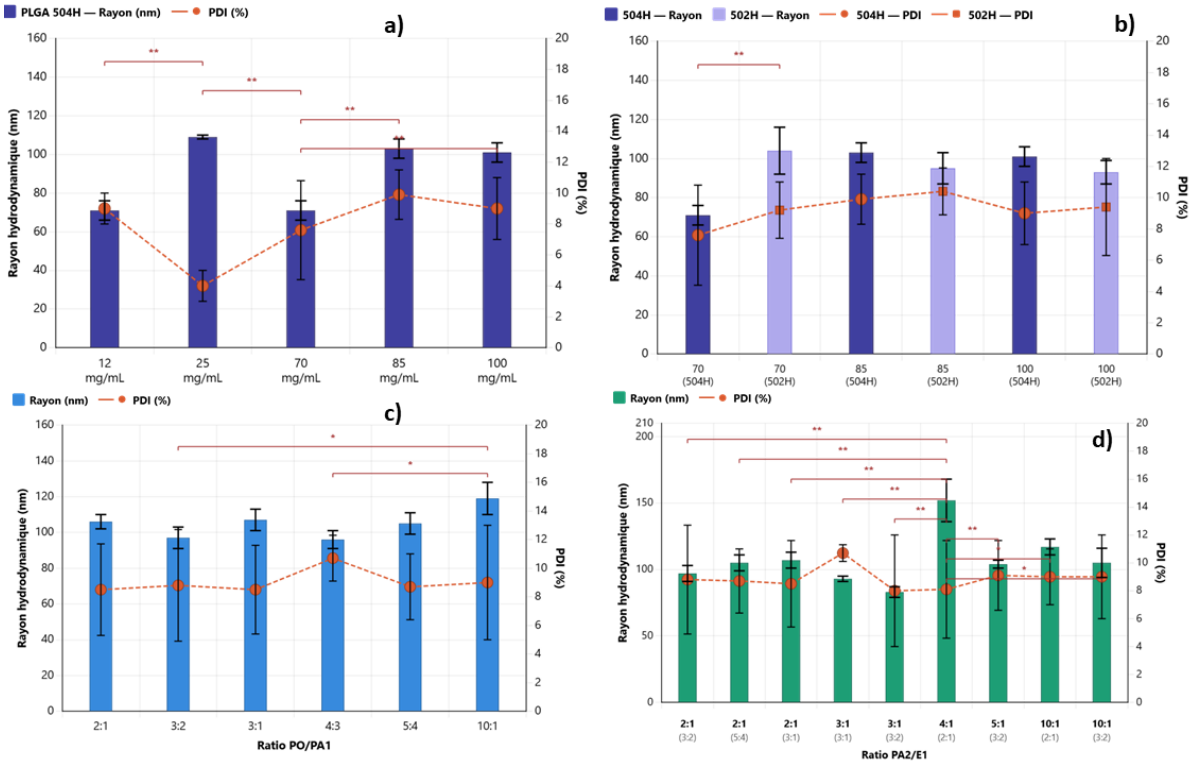



**Figure 29 : Influence des paramètres de formulation sur le rayon hydrodynamique moyen et l'indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules.** *(*a) Effet de la concentration en PLGA 504H (12, 25, 70, 85 et 100 mg/mL) sur le rayon hydrodynamique et le PDI. (b) Comparaison des grades PLGA 504H et 502H aux concentrations de 70, 85 et 100 mg/mL. (c) Effet du ratio volumique phase organique/phase aqueuse interne (PO/PA1) sur la taille et le PDI des nanoparticules (PLGA 504H, 100 mg/mL, PA2/E1 = 2:1 fixé). (d) Effet du ratio volumique phase aqueuse externe/émulsion primaire (PA2/E1) sur la taille et le PDI, pour différents ratios PO/PA1 associés (indiqués entre parenthèses). Toutes les formulations sont des nanoparticules vides (sans TZB), stabilisées au PVA 2 %, n = 3. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Seules les comparaisons statistiquement significatives sont indiquées (test post-hoc de Tukey après ANOVA) : * $p<0,05$ · ** $p<0,01$. PA2 : phase aqueuse externe · E1 : émulsion primaire · PO : phase organique · PA1 : phase aqueuse interne.

#### Influence de la concentration en PLGA

La figure 29a ne montre aucune corrélation linéaire entre la concentration en PLGA 504H et le rayon hydrodynamique des nanoparticules. Quelle que soit la concentration testée (12 à 100 mg/mL), les rayons obtenus restent généralement dans la plage cible

d'environ 100 nm, sans variation significative de l'indice de polydispersité (PDI) (inférieur à 20%) indiquant une distribution granulométrique homogène.

**Comparaison des grades de PLGA**

Les grades 504H (38 000–54 000 Da) et 502H (7 000–17 000 Da) n'ont présenté aucune différence significative en termes de taille ou de PDI aux concentrations de 70, 85 et 100 mg/mL (Figure 29b). Toutefois, le grade 504H a affiché une meilleure reproductibilité de la taille. Sa masse molaire plus élevée pourrai permettre également une dégradation plus lente du polymère, favorisant ainsi une libération plus prolongée du TZB.

**Influence des rapports ou ratios volumiques PO/PA1 et PA2/E1**

L'influence des rapports volumiques sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules est illustrée par les figures 29c et 29d. Concernant le rapport PO/PA1, seul le rapport 10 :1 a conduit à des nanoparticules significativement plus grandes que celles obtenues avec les autres rapports testés, notamment le rapport 3:2 (Figure 29c). Tous les autres rapports testés (2:1, 3:1, 4:3, 5:4) ont permis d'obtenir des tailles comparables et satisfaisantes. Quant au rapport PA2/E1, le rapport 4:1 associé à un rapport PO/PA1 de 2:1 s'est distingué en produisant des nanoparticules nettement plus grandes (152 ± 16 nm) que celles issues de toute autre condition testée (Figure 29d). Ces observations ont conduit à retenir les rapports PO/PA1 de 3:2 et PA2/E1 de 2:1, qui offrent le meilleur compromis entre taille, uniformité et reproductibilité dans les conditions optimisées.

Les conditions de formulation retenues ont ensuite été utilisées pour évaluer l'effet de l'encapsulation du trastuzumab sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules et sur l'efficacité d'encapsulation, présentés dans la section suivante.

### C.2.3 Influence de l'incorporation du trastuzumab sur les propriétés physico-chimiques et l'efficacité d'encapsulation

Dans un premier temps, l'influence de l'incorporation du trastuzumab sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules a été évaluée. Comme le montre la figure 30a, l'incorporation du TZB n'a entraîné aucune modification significative du rayon hydrodynamique ni de PDI par rapport aux nanoparticules vides préparées dans les mêmes conditions.

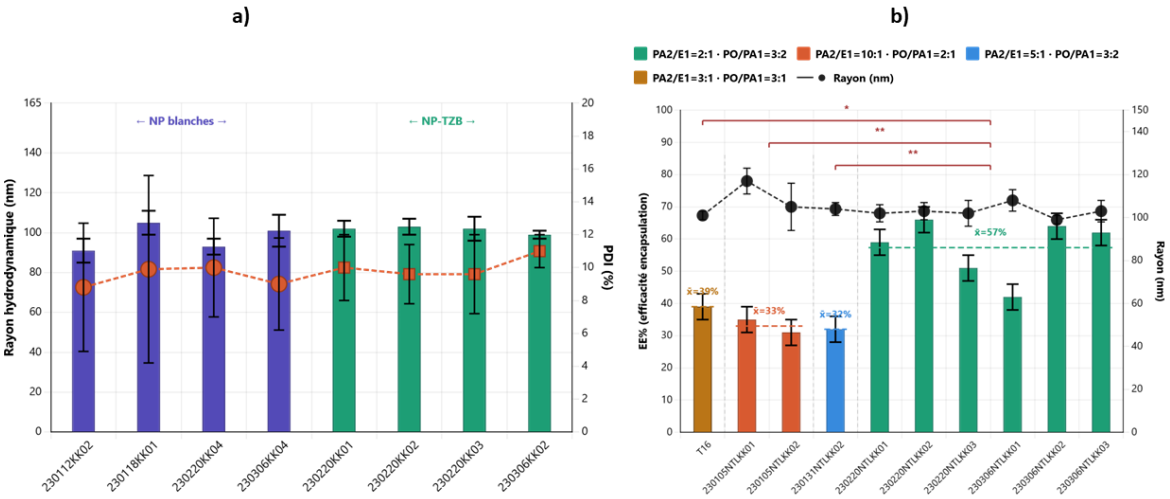



**Figure 30: Influence de l'encapsulation du trastuzumab sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules** : a) Influence sur la distribution de taille des nanoparticules préparées dans des conditions identiques (PLGA 504H, 100 mg/mL, PVA 2 %, PA2/E1 = 2:1, PO/PA1 = 3:2) (n=3). b) Influence du ratio volumique PA2/E1 sur l'efficacité d'encapsulation. Les barres sont colorées en fonction du rapport volumique utilisé : vert (PA2/E1 = 2:1 · PO/PA1 = 3:2), orange (PA2/E1 = 10:1 · PO/PA1 = 2:1), bleu (PA2/E1 = 5:1 · PO/PA1 = 3:2) et ambre (PA2/E1 = 3:1 · PO/PA1 = 3:1). Les comparaisons statistiquement significatives entre le groupe PA2/E1 = 2:1 et les autres groupes sont indiquées par des accolades (test *post-hoc* de Tukey après ANOVA : * $p<0,05$ · ** $p<0,01$). Toutes les formulations contiennent 1 mg de TZB (PLGA 504H, 100 mg/mL, PVA 2 %, n = 3). PA2 : phase aqueuse externe · E1 : émulsion primaire · PO : phase organique · PA1 : phase aqueuse interne.

Par ailleurs, la modification des rapports de volume PA2/E1 et PO/PA1 en présence de TZB n'a eu aucun effet significatif sur le rayon hydrodynamique, qui est resté proche de 100 nm dans toutes les conditions testées. En revanche, l'efficacité d'encapsulation s'est révélée dépendante de ces ratios (Figure 30b). Les formulations préparées avec un ratio de PA2/E1 de 2:1 associé à un ratio de PO/PA1 de 3:2 ont permis d'obtenir les efficacités d'encapsulation les plus élevées, avec une moyenne de 57 %, supérieure à celles obtenues avec des rapports PA2/E1 de 10:1 (33 %), 5:1 (32 %) et 3:1 (39 %). Ces résultats suggèrent qu'un ratio PA2/E1 élevé pourrait favoriser la diffusion du TZB de la phase aqueuse interne vers la phase aqueuse externe lors de la formation de l'émulsion secondaire, réduisant ainsi la quantité d'anticorps réellement encapsulée. Par conséquent, le rapport PA2/E1 de 2:1 combiné au rapport PO/PA1 de 3:2 a été retenu comme condition pour la poursuite du développement, car il offrait le meilleur compromis entre une taille contrôlée et une efficacité d'encapsulation satisfaisante.

### C.2.4 Influence de la quantité de trastuzumab introduite et de la concentration de la solution mère utilisée sur les propriétés physico-chimiques et l'efficacité d'encapsulation

L'augmentation de la quantité de TZB introduite dans la phase aqueuse interne, passant de 1 mg à 2 mg, a entraîné une diminution notable de l'efficacité d'encapsulation (EE%, passant de 57 % à 24 %), comme l'illustre la figure 31a. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la saturation de la capacité d'encapsulation de la

matrice polymère en PLGA : pour une concentration en polymère donnée, une quantité excessive d'anticorps dans la phase interne favoriserait sa diffusion vers la phase aqueuse externe lors de la formation de l'émulsion secondaire, réduisant ainsi la fraction réellement piégée dans la matrice.

L'effet de la concentration de la solution mère de TZB utilisée lors de la préparation de l'émulsion primaire a ensuite été étudié. Les résultats présentés sur la figure 31b montrent une augmentation de l'efficacité d'encapsulation à partir d'une concentration de 3,5 mg/mL, atteignant une valeur maximale de 73 %. Toutefois, cette tendance n'a pas pu être confirmée statistiquement en raison du nombre limité de répétitions effectuées aux concentrations de 6,8 mg/mL et 12 mg/mL.

Toutefois, la détermination la capacité de chargement (DL%) permettrait de compléter et d'affiner l'interprétation de ces résultats en quantifiant la teneur réelle en TZB par unité de masse de nanoparticules. De même, l'étude de la cinétique de libération *in vitro* constituera une étape essentielle pour évaluer la pertinence de la formulation et comparer les différentes formulations en fonction de leurs profils de libération.

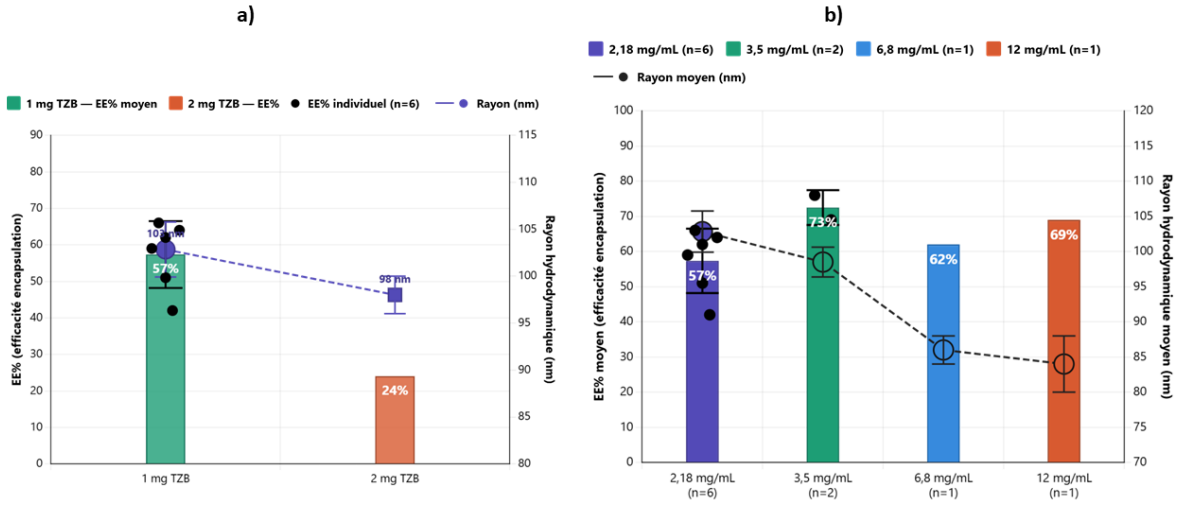



**Figure 31** : **Influence de la quantité et de la concentration de trastuzumab introduites dans la phase aqueuse interne sur l'efficacité d'encapsulation (EE %) et le rayon hydrodynamique des nanoparticules de PLGA.** (a) Effet de la quantité de TZB introduite (1 ou 2 mg) dans des conditions de formulation identiques (PLGA 504H, 100 mg/mL, PVA à 2 %, PA2/E1 = 2:1, PO/PA1 = 3:2). (b) Effet de la concentration en TZB dans la phase aqueuse interne, avec une quantité fixée à 1 mg et dans les mêmes conditions de formulation (PLGA 504H, 100 mg/mL, PVA 2 %, PA2/E1 = 2:1, PO/PA1 = 3:2). Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Aucun test statistique n'a été réalisé en raison du faible nombre de réplicats pour certaines conditions.

Toutes les formulations évaluées dans cette étude, ainsi que leurs conditions de préparation et leurs principales caractéristiques physico-chimiques, sont présentées dans le tableau 7 (données supplémentaires). Ce tableau récapitule les différentes conditions étudiées, notamment la concentration et le grade de PLGA, le type de

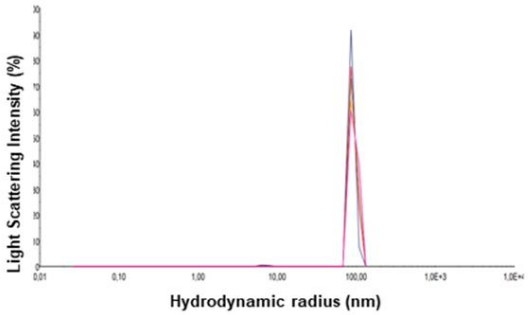
stabilisant, les rapports volumiques et les conditions d'encapsulation du trastuzumab. Il permet de retracer les différentes étapes ayant conduit à la sélection de la formulation retenue pour une caractérisation ultérieure.

Au regard des résultats obtenus, la formulation retenue pour la suite de l'étude consiste en des nanoparticules de PLGA 504H (100 mg/mL) préparées par double émulsion suivie d'une évaporation du solvant, stabilisées par du PVA à 2 % et utilisant des rapports volumiques PO/PA1 et PA2/E1 de 3:2 et 2:1, respectivement. Dans ces conditions, les nanoparticules chargées en trastuzumab (NP-TZB) présentent un rayon hydrodynamique moyen de 93,8 ± 6,3 nm, un indice de polydispersité (PDI) de 9,4 ± 1,8 % et une efficacité d'encapsulation de 57 ± 9 %. Les analyses par DLS révèlent une distribution de taille unimodale, tandis que les observations en MET montrent des nanoparticules sphériques de taille uniforme (Figure 32). Cette formulation a été sélectionnée pour les études ultérieures, notamment l'évaluation de la cinétique de libération *in vitro* et de la perméabilité à travers l'épithélium nasal.

a)

| Code | Paramètres de formulation | | | | Caractérisation physicochimique | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Grade PLGA | Conc. PLGA (mg/mL) | Ratio PO/PA1 | Ratio PA2/E1 | Rayon hydrodyn. (nm) | PDI (%) | Potentiel zêta moyen ± ET (mV) | EE% moyen ± ET |
| **NP-TZB** | 504H | 100 | 3:2 | 2:1 | 93,8 ± 6,3 | 9,4 ± 1,8 | −1,9 ± 4,07 | **57 ± 9 %** |
| **NP** | 504H | 100 | 3:2 | 2:1 | 93,2 ± 3,1 | 9,6 ± 0,9 | −9,87 ± 9,8 | — |

b)




c)

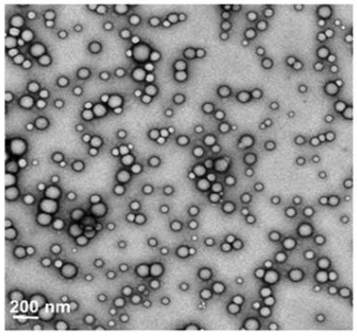



**Figure 32: Caractérisation physico-chimique de la formulation sélectionnée pour la suite de l'étude.** (a) Tableau récapitulatif des paramètres de formulation et des principales caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules chargées en trastuzumab (NP-TZB) et des nanoparticules vides (NP) préparées à partir de PLGA 504H (100 mg/mL), de PVA à 2 %, d'un rapport PO/PA1 de 3:2 et d'un rapport PA2/E1 de 2:1. (b) profil de distribution de taille des NP-TZB déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS), montrant une distribution unimodale. (c) Image de microscopie électronique en transmission (MET) des NP-TZB montrant des nanoparticules sphériques de taille uniforme. Barre d'échelle : 200 nm; PDI : indice de polydispersité ; EE % : efficacité d'encapsulation ; SD : écart-type.

## C.3 Cinétique de libération du TZB à partir des formulations de nanoparticules

Les nanoparticules de PLGA sont largement utilisées pour développer des systèmes à libération contrôlée. La cinétique de libération dépend des caractéristiques du polymère, en particulier du rapport lactide/glycolide et de la masse molaire. Dans un premier temps, la cinétique de libération du trastuzumab a été évaluée à l'aide de nanoparticules préparées avec du PLGA 50/50 (504H).

Comme le montre la figure 33a, les nanoparticules de PLGA 50/50 présentent une cinétique de libération biphasique. Une libération rapide du TZB est observée au cours des premières heures « *burst release* », suivie d'une phase de libération plus lente. Après cette phase initiale, la quantité cumulée de TZB libéré reste relativement stable, atteignant environ 40 à 50 % sur toute la durée du suivi.

Afin d'évaluer l'influence de la composition du polymère sur ce profil de libération, des nanoparticules préparées avec du PLGA 75/25, connu pour se dégrader plus lentement ont également été étudiées. Les nanoparticules obtenues présentaient une taille comparable à celles préparées avec du PLGA 50/50, mais affichaient une efficacité d'encapsulation moyenne plus faible (27 %). Néanmoins, comme l'illustre la figure 33b, elles présentent un profil de libération très similaire à celui observé avec le PLGA 50/50. On observe également une phase initiale de libération rapide suivie d'un plateau, sans différence significative quant au pourcentage de TZB libéré.

Ces résultats démontrent que, dans les conditions étudiées, le passage d'un rapport lactide/glycolide de 50/50 à 75/25 ne réduit ni la phase de libération initiale ni modifie de manière significative le profil de libération du trastuzumab.

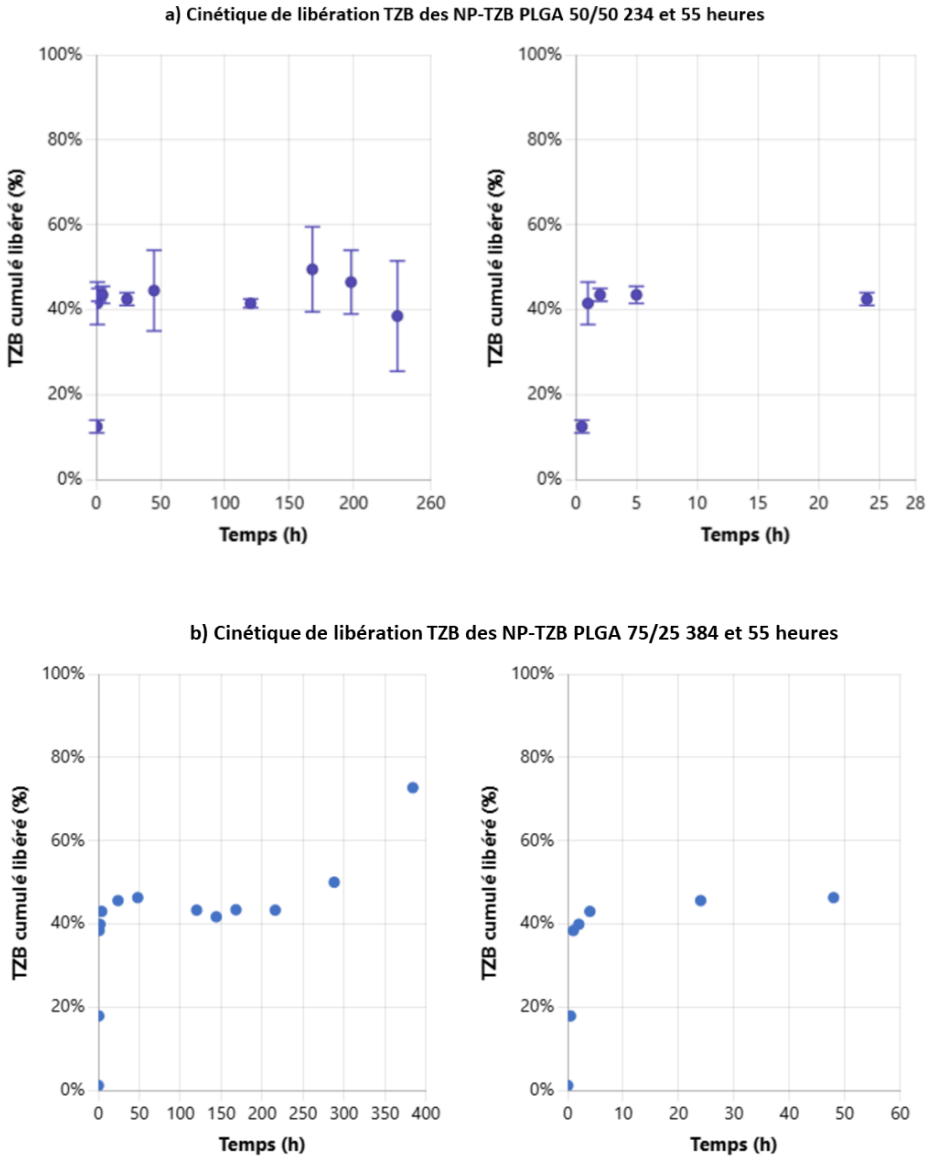



**Figure 33 : Cinétique de libération *in vitro* du trastuzumab (TZB) à partir de nanoparticules de PLGA incubées dans du PBS à 37 °C.** (a) Nanoparticules préparées avec du PLGA 50/50 (504H). (b) Nanoparticules préparées avec du PLGA 75/25. Les graphiques de droite présentent un agrandissement des premières heures de libération afin de mieux visualiser la phase initiale (libération initiale rapide ou « *burst release* »)

Afin de mieux caractériser la libération du TZB et d'évaluer la fraction restant dans les nanoparticules après 24 h, une étude complémentaire a été menée en utilisant la formulation PLGA 50/50. Après une incubation de 24 h dans du PBS à 37 °C, les nanoparticules ont été lavées trois fois avec du PBS, puis lysées dans une solution de NaOH 0,5 N. L'analyse ELISA des surnageants de lavage (Figure 34a) montre que la concentration en TZB diminue à des niveaux très faibles dès le premier lavage, confirmant ainsi l'efficacité du protocole de lavage. Comme l'illustre la Figure 34b, environ 43 % de la quantité totale de TZB est libérée dans le PBS au bout de 24 h, un résultat cohérent avec le plateau observé dans la cinétique de libération. À l'inverse,

environ 56 % du TZB reste encastré dans les nanoparticules après le lavage et n'est libéré qu'au moment de la lyse du PLGA alcaline, ce qui démontre que la libération est incomplète après 24 h. Enfin, les mesures par DLS (Figure 34c) indiquent que le rayon hydrodynamique des nanoparticules demeure stable après la libération (101 ± 5 nm avant contre 97 ± 5 nm après ; différence non significative), ce qui atteste que les nanoparticules conservent leur intégrité durant les 24 premières heures d'incubation dans le PBS.

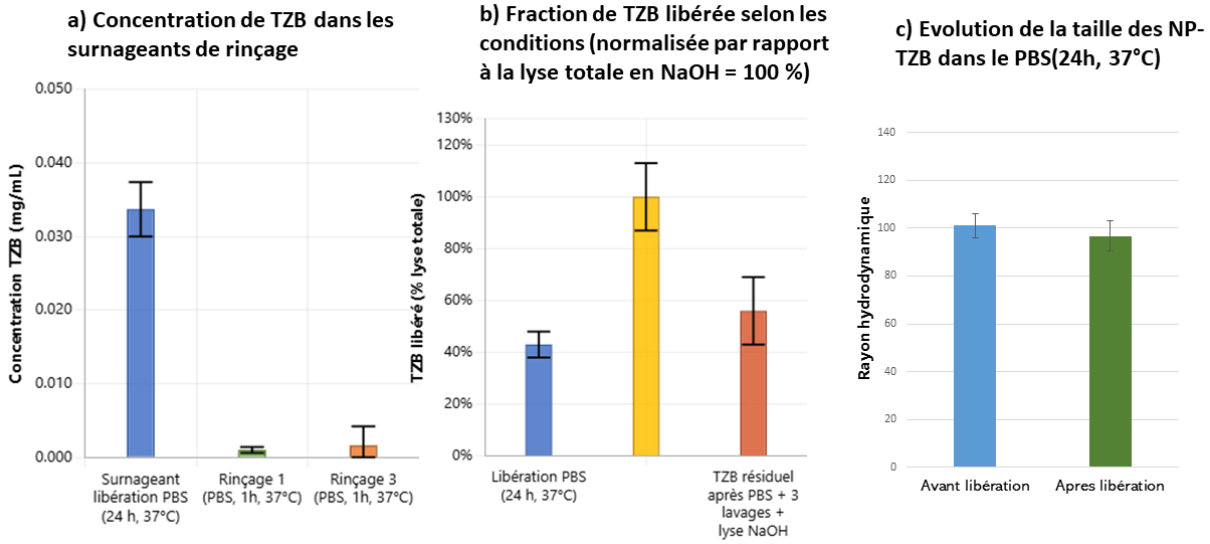



**Figure 34 : Caractérisation de nanoparticules de PLGA 50/50 chargées en trastuzumab (NP-TZB) après 24 h de libération dans du PBS à 37 °C**. (a) Concentration en trastuzumab (TZB) mesurée par ELISA dans le surnageant de libération (24 h) puis dans les surnageants issus de lavages successifs au PBS. (b) Fraction de TZB libérée après 24 h dans du PBS et fraction résiduelle récupérée après trois lavages suivis d'une lyse des nanoparticules dans du NaOH 0,5 N. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité totale de TZB obtenue après lyse complète (100 %). (c) Rayon hydrodynamique moyen des NP-TZB avant et après 24 h d'incubation dans du PBS, déterminé par DLS. n = 3.

## C.4 caractérisation de TZB libéré à partir des nanoparticules

Afin de vérifier que le procédé de formulation n'a pas altéré le trastuzumab, les propriétés du TZB libéré ont été comparées à celles du TZB natif. La structure du TZB a été évaluée par SDS-PAGE en conditions non dénaturantes ainsi que par l'analyse des courbes de dénaturation thermique. Comme le montrent les figures 35a et 35b, aucune différence significative n'a été observée entre le TZB natif et le TZB libéré, que ce soit au niveau des profils de migration ou des spectres de fluorescence de la dérivée première. Enfin, l'analyse par cytométrie en flux révèle que le profil de liaison aux cellules BT474 surexprimant HER2 est conservé après encapsulation et libération, ce qui indique que la fonctionnalité du TZB est préservée (Figure 35c).

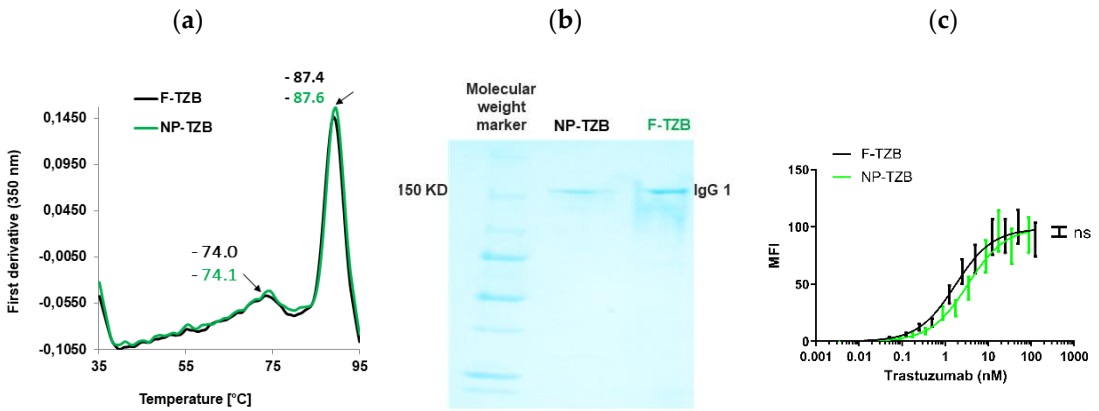



**Figure 35: Évaluation de l'intégrité physique, structurelle et fonctionnelle du trastuzumab (TZB) libéré à partir de nanoparticules de PLGA dans du PBS (pH 7,4) à 37 °C**. (a) Analyse du TZB par SDS-PAGE. (b) Spectres de fluorescence intrinsèque (première dérivée) en fonction de la température, obtenus lors d'essais de dénaturation thermique. (c) Évaluation de la liaison du TZB à des cellules BT474 surexprimant HER2 par cytométrie en flux (n = 2). MFI : intensité de fluorescence moyenne ; ns : différence non significative (p > 0,05).

# D. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La formulation d'anticorps monoclonaux tels que le trastuzumab est de nos jour bien établie pour les voies d'administration systémique en clinique. Les approches conventionnelles visent à stabiliser l'anticorps face aux principales voies de dégradation comme l'oxydation, la désamidation, l'hydrolyse et l'agrégation. Cette approche se fait au moyen de formulations tamponnées enrichies en excipients protecteurs (par exemple, des sucres, des polyols ou des acides aminés) et de procédés comme la lyophilisation. Le principal défi lié à la voie systémique réside dans l'administration de solutions hautement concentrées, en particulier lors du passage d'une administration intraveineuse à une administration sous-cutanée, où le volume injectable est plus restreint.

Dans le cadre de ce travail, le cahier des charges est différent. L'objectif est non seulement d'assurer la stabilité de l'anticorps, mais aussi de répondre aux contraintes spécifiques de la voie nasale notamment la présence d'enzymes protéolytiques, la clairance mucociliaire, volume limité de la cavité nasale et nécessité de franchir la barrière épithéliale. Ces obstacles rendent les formulations conventionnelles inadaptées, conduisant à rechercher des approches alternatives. Notre choix s'est porté sur la nanotechnologie, pour protéger et vectoriser le trastuzumab depuis la cavité nasale jusqu'au cerveau via la voie N2B.

D'après la littérature, plusieurs systèmes de nanoparticules capables de transporter des macromolécules par voie intranasale ont été envisagés, notamment les nanoparticules lipidiques et polymériques. Les nanoparticules lipidiques (LNP) ont suscité un intérêt considérable ces dernières années, en particulier avec le développement de vaccins à ARNm contre la COVID-19. Toutefois, ces LNP ont été principalement conçus pour l'administration d'acides nucléiques. Leur efficacité repose sur l'association entre des lipides ionisables et la charge négative dense et uniforme (squelette phosphate chargé négativement) de l'ARNm, ainsi que sur leur capacité à faciliter l'échappement endosomal après internalisation cellulaire [279]. Bien que des protéines thérapeutiques puissent également être formulées dans des systèmes lipidiques, l'encapsulation de des anticorps monoclonaux, tels que le trastuzumab, demeure plus complexe et se traduit généralement par une efficacité d'encapsulation limitée du fait de leur faible densité de charge pouvant nécessiter une modification chimique spécifique préalable [280]. Par ailleurs, les LNP ont été principalement développées pour acheminer des molécules agissant en intracellulaire, telles que l'ARNm. Le trastuzumab agit en se liant au récepteur HER2 situé à la surface des cellules tumorales. Nous avons donc opté pour des nanoparticules polymères, mieux adaptées à l'encapsulation et à la libération contrôlée de cet anticorps.

Dans un premier temps, des nanoparticules de chitosane préparées par gélification ionique (figure S1 et S2) avec du tripolyphosphate de sodium (TPP) ont été étudiées. Ce polymère a été choisi pour ses propriétés mucoadhésives et sa capacité à ouvrir transitoirement les jonctions serrées, des caractéristiques favorables pour l'administration intranasale. Toutefois, les formulations obtenues présentaient de grande taille, une distribution granulométrique hétérogène multimodale, ne répondant pas aux spécifications établies (taille inférieure à 200 nm) (figure S3). De plus, la solubilisation du chitosane naturel utilisé nécessite un milieu acide peu compatible avec la stabilité du TZB. Aussi, l'obtention de particules plus petites aurait nécessité une sonication prolongée (figure S3), susceptible d'altérer l'anticorps. Cette approche a également été décrite dans la littérature pour l'encapsulation d'un autre anticorps thérapeutique, le bevacizumab, par gélification ionique dans le cadre d'une administration transsclérale. Les auteurs rapportent des résultats similaires, avec des nanoparticules de taille hétérogène comprise entre 80 et 380 nm [281]. Face à ces limites, les systèmes hybrides associant un noyau PLGA et un enrobage chitosane sont désormais plus privilégiés [282]. Au regard de ces résultats préliminaires (figure S3) et la quantité limitée de TZB disponible, ces essais ont été réalisés uniquement sur des nanoparticules vides. Cette approche n'a donc pas été poursuivie.

Le développement de la formulation, s'est orienté par la suite vers les nanoparticules de PLGA. Un polymère synthétique, biodégradable et biocompatible approuvé par les autorités. Les données de la littérature ont montré leur capacité à formuler une large gamme de molécules, qu'elles soient hydrophobes ou hydrophiles, de petites ou de macromolécules et à assurer leur libération contrôlée. La méthode double émulsion et évaporation de solvant a été retenue comme la technique la plus appropriée pour encapsuler le TZB, une macromolécule hydrophile.

Le choix du solvant organique constituait également un paramètre clé. Bien que le dichlorométhane (DCM) soit largement utilisé pour préparer des nanoparticules de PLGA par la technique de double émulsion, il est classé comme solvant de classe 2 selon les directives de l'ICH et est suspecté d'être cancérigène et mutagène. Par conséquent, sa teneur résiduelle dans les produits pharmaceutiques est strictement limitée (600 ppm). Cependant, l'acétate d'éthyle est un solvant de classe 3 considéré comme moins toxique avec une limite résiduelle autorisée plus élevée (5 000 ppm) [283]. Ainsi, l'acétate d'éthyle a été retenu pour cette étude, afin d'anticiper les contraintes liées au futur développement clinique.

La méthode de double émulsion évaporation de solvant présente des contraintes mécaniques et interfaciales dont la sonication et les interfaces air/liquide ou solvant organique/eau, susceptibles d'altérer la structure et la fonctionnalité de l'anticorps. Afin de limiter ces risques, la stabilité du TZB face à ces contraintes a été évaluée au préalable et plusieurs mesures de protection ont été mises en place. La sonication a

été réalisée de manière séquentielle et à froid (dans la glace) pour restreindre les élévations de température localisées. L'incorporation de Poloxamer 188 (P188), un surfactant non ionique, dans la phase aqueuse interne a permis de minimiser l'exposition du TZB aux interfaces hydrophobes. En effet, la sonication génère des contraintes mécaniques importantes ainsi que de nombreuses interfaces air-eau qui se créent et se détruisent rapidement susceptibles de favoriser l'adsorption du TZB et la formation d'agrégats. Le P188, s'adsorbe préférentiellement à ces interfaces, limitant ainsi l'exposition du TZB aux surfaces hydrophobes et réduisant le risque d'agrégation. La littérature indique que cette stratégie protège plus efficacement les anticorps monoclonaux que le polysorbate 20 lors de l'agitation [284]. Ces précautions se sont révélées efficaces ; les résultats d'électrophorèse SDS-PAGE, les courbes de dénaturation thermique et les profils de liaison aux cellules BT474 ont confirmé que la structure et la fonctionnalité du TZB demeuraient parfaitement intactes après la formulation et la libération.

Le développement de la formulation a ensuite consisté à identifier des paramètres influençant les caractéristiques des nanoparticules. L'objectif était d'obtenir dans un premier temps des particules d'un diamètre inférieur à 200 nm pour faciliter la diffusion à travers le mucus nasal, dont la taille des pores avoisine en moyenne 200 nm. Dans un second temps le but était de maintenir un taux d'encapsulation de TZB élevé afin de réduire le volume à administrer. Plusieurs paramètres connus pour influencer les caractéristiques des nanoparticules préparées par double émulsion ont ainsi été étudiés : la concentration et le grade du PLGA, les rapports volumiques des différentes phases de l'émulsion ainsi que le choix du stabilisant.

Contrairement à ce qui est souvent décrit dans la littérature, l'augmentation de la concentration en PLGA n'a pas entraîné d'augmentation significative de la taille des nanoparticules dans notre étude. Plusieurs études rapportent qu'une concentration plus élevée en polymère augmente la viscosité de la phase organique, ce qui limite la fragmentation des gouttelettes lors de la sonication et conduit à des tailles de particules plus grandes. Cette augmentation de viscosité ralentit également la diffusion du solvant organique vers la phase aqueuse externe et peut modifier la solidification des nanoparticules [285,286]. Dans notre cas, cette influence est probablement limitée car l'énergie ou l'amplitude de sonication utilisée était suffisante pour compenser l'augmentation de la viscosité sur la plage de concentrations étudiée.

De même, les grades 502H (rapport L/G 50/50, masse moléculaire 7 000 à 17 000 Da) et 504H (rapport L/G 50/50, masse moléculaire 38 000 à 54 000 Da) n'ont pas montré de différence significative en termes de taille des nanoparticules. En revanche, le grade 504H a montré une meilleure reproductibilité entre les différents lots. Cette observation pourrait être liée à sa masse moléculaire plus élevée, qui augmente la viscosité de la phase organique et pourrait favoriser une formation plus homogène de

gouttelettes lors de la première émulsion [211]. Le choix du grade 504H repose également sur sa masse moléculaire plus élevée, associée à une dégradation plus lente de la matrice polymère et donc une libération prolongée de molécule.

La proportion de chacune des phases de l'émulsion est importante pour les caractéristiques des nanoparticules générées. Le rapport volumique entre la phase organique et la phase aqueuse interne PO/PA1 détermine le volume des gouttelettes de la première émulsion ainsi que l'épaisseur de la matrice polymère entourant la phase interne. Lorsque la quantité de phase organique est insuffisante, cela peut favoriser une fuite de la phase aqueuse interne vers l'extérieur. A l'inverse, une phase organique trop importante augmente la viscosité globale de l'émulsion et conduit à la formation de gouttelettes plus grosses[287]. Dans notre étude, seul le rapport 10:1 a conduit à des nanoparticules nettement plus grosses, probablement en raison de cette augmentation de viscosité. Le rapport PA2/E1 influence la stabilité de l'émulsion secondaire ainsi que la diffusion du trastuzumab de la phase aqueuse interne vers la phase aqueuse externe avant solidification du polymère [287]. Une augmentation du volume de la phase aqueuse externe augmente le gradient de concentration entre les deux phases aqueuses et favorise ainsi la diffusion du TZB hors des gouttelettes internes, ce qui réduit l'efficacité de l'encapsulation. Cette hypothèse est en accord avec nos résultats : le rapport PA2/E1 de 2 : 1 atteint l'efficacité d'encapsulation la plus élevée (57 %), tandis que des ratios plus élevés (3 : 1, 5 : 1 et 10 : 1) conduisent à un EE% compris entre 33 et 39 %. Des observations similaires ont été rapportées pour l'encapsulation de protéines et d'autres macromolécules hydrophiles par double émulsion, où le rapport entre l'émulsion primaire et la phase aqueuse externe est décrit comme l'un des paramètres les plus influents sur l'efficacité de l'encapsulation [287].

La cinétique de libération observée avec ce PLGA 50/50 est biphasique, caractérisée par une phase initiale de libération rapide («*burst release*») représentant environ les 40 à 50% du TZB encapsulé dans les premières heures suivie d'un plateau prolongé. Ce profil est en accord avec ce qui est fréquemment décrit dans la littérature pour les nanoparticules de PLGA chargées en petites molécules et protéines qui décrivent une libération généralement incomplète dans le PBS (inférieur à 70% dans les 48 heures)[288]. Afin d'atténuer cette phase initiale, le PLGA 75/25 présentant une teneur plus élevée en acide lactique et étant donc plus hydrophobe, a été évalué. Cependant, cette modification n'a pas permis de réduire la libération initiale rapide. Le profil biphasique observé est caractéristique des nanoparticules de PLGA encapsulant des protéines. La phase de libération initiale rapide est généralement attribuée à la diffusion de molécules adsorbées ou localisées à proximité de la surface des nanoparticules, tandis que la phase plus lente correspond à la diffusion progressive du principe actif à travers la matrice polymère puis à la dégradation du PLGA [288,289]. Le fait que le passage d'un PLGA 50/50 à un PLGA 75/25 n'ait pas modifié cette phase

initiale suggère qu'elle dépend principalement de la localisation du TZB dans la nanoparticule plutôt que de la cinétique de dégradation du polymère. Le revêtement de chitosane sur des nanoparticules de PLGA constitue une stratégie intéressante pour limiter la diffusion rapide du TZB tout en apportant des propriétés mucoadhésives. Cependant, dans les conditions étudiées, cette approche a abouti à une augmentation significative de la taille des nanoparticules, dépassant les spécifications fixées pour une administration intranasale. Une optimisation plus poussée des conditions de dépôt pourrait néanmoins permettre de mieux exploiter cette stratégie.

La formulation finale retenue présente un diamètre d'environ 186 nm, une distribution de taille étroite (PDI < 20 %) et une efficacité d'encapsulation satisfaisante (57 ± 9 %). La présence de trastuzumab n'a pas modifié de manière significative la taille des nanoparticules, un résultat cohérent avec plusieurs études portant sur des nanoparticules de PLGA préparées par double émulsion. La taille est compatible avec les recommandations généralement proposées pour favoriser la diffusion des nanoparticules dans le mucus nasal dont les pores ont un diamètre moyen de l'ordre de 100 à 300 nm selon leur hydratation [172].

Les nanoparticules obtenues présentent également un potentiel zêta proche de la neutralité (potentiel zêta de −1,9 mV pour les NP-TZB contre −9,87 mV pour les NP vides). Bien que les nanoparticules cationiques soient généralement décrites comme favorisant la muco-adhésion, les nanoparticules faiblement chargées ou proches de la charge neutre présentent généralement une meilleure diffusion dans le mucus[290]. Cette caractéristique pourrait favoriser leur accès à l'épithélium nasal avant leur internalisation.

La lyophilisation qui est une étape permettant d'améliorer la stabilité de la conservation des formulations protéiques sur le long terme a été effectuée en présence de 10 % de tréhalose et a permis de préserver les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules. Les analyses effectuées après la libération du TZB dans du PBS démontrent que la structure et la fonctionnalité de l'anticorps sont préservées, confirmant ainsi que le procédé de formulation n'altère pas ses propriétés biologiques.

Enfin, malgré une efficacité d'encapsulation satisfaisante, la capacité de chargement en DL demeure limitée (DL% = 1,83 ± 0,34 %). Compte tenu des doses thérapeutiques requises pour le trastuzumab (en moyenne 4 mg/kg), ce paramètre constitue un axe d'amélioration majeur afin de réduire la quantité de nanoparticules à administrer. Néanmoins, afin d'évaluer la pertinence biologique de ce système, des études de perméabilité utilisant des modèles *in vitro* ont été entreprises et sont présentées dans la section suivante.

# E. DONNEES SUPPLEMENTAIRES

**Tableau 7 : Récapitulatif des essais de formulation des nanoparticules de PLGA réalisés au cours de ce travail. Synthèse des paramètres de formulation évalués et des caractéristiques physicochimiques des nanoparticules de PLGA**

| Code formule | PLGA (grade) | Conc. PLGA (mg/mL) | Ratio PA2/E1 | Ratio PO/PA1 | Stabilisant | Conc. stabilisant | CS PA2 | Conc. TZB (mg/mL) | Qté TZB introduit | Rayon (nm) ± ET | PDI (%) ± ET | EE% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Criblage de la concentration en PLGA (grade 504H, PVA, ratio PA2/E1 = 2:1)** | | | | | | | | | | | | |
| K13 | 504H | 12 | 2:1 | 5:4 | PVA | 0,8% | — | — | — | 68 ± 3 | 9 ± 1 | — |
| K5 | 504H | 12 | 2:1 | 10:1 | PVA | 2% | — | — | — | 97 ± 7 | 9 ± 5 | — |
| K9 | 504H | 12 | 2:1 | 5:4 | PVA | 2% | — | — | — | 82 ± 5 | 10 ± 1 | — |
| K14 | 504H | 12 | 2:1 | 5:4 | PVA | 0,8% | 0,1% | — | — | 165 ± 25 | 12 ± 9 | — |
| K12 | 504H | 25 | 2:1 | 10:1 | PVA | 2% | — | 1,87 | — | 109 ± 1 | 4 ± 1 | — |
| K10 | 504H | 70 | 2:1 | 5:4 | PVA | 2% | — | 1,18 | — | 100 ± 6 | 9 ± 1 | — |
| K15 | 504H | 70 | 2:1 | 5:4 | PVA | 2% | — | — | — | 66 ± 1 | 7 ± 2 | — |
| **Criblage des ratios volumiques (PLGA 504H, 100 mg/mL, PVA 2%)** | | | | | | | | | | | | |
| T15 | 504H | 100 | 3:1 | 3:1 | PVA | 2% | — | — | — | 93 ± 2 | 11 ± 1 | — |
| T17 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | — | — | 83 ± 4 | 8 ± 4 | — |
| 230112NTLKK01 | 504H | 100 | 2:1 | 5:4 | PVA | 2% | — | — | — | 105 ± 6 | 8,7 ± 2,3 | — |
| 230112NTLKK02 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | — | — | 91 ± 6 | 8,8 ± 3,9 | — |
| 230112NTLKK03 | 504H | 100 | 2:1 | 3:1 | PVA | 2% | — | — | — | 107 ± 6 | 8,5 ± 3,1 | — |
| 230112NTLKK04 | 504H | 100 | 2:1 | 4:3 | PVA | 2% | — | — | — | 96 ± 5 | 10,7 ± 1,6 | — |
| 230111NTLKK01 | 504H | 100 | 4:1 | 2:1 | PVA | 2% | — | — | — | 124 ± 5 | 11,4 ± 0,7 | — |
| 230126NTLKK07 | 504H | 100 | 2:1 | 2:1 | PVA | 2% | — | — | — | 106 ± 4 | 8,5 ± 3,2 | — |
| 230126NTLKK08 | 504H | 100 | 2:1 | 5:4 | PVA | 2% | — | — | — | 105 ± 3 | 8,4 ± 2,4 | — |
| 230126NTLKK09 | 504H | 100 | 2:1 | 3:1 | PVA | 2% | — | — | — | 104 ± 7 | 10,8 ± 1,0 | — |
| **Criblage de la concentration en PLGA (ratio PA2/E1 = 4:1, PO/PA1 = 2:1, 504H)** | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 230110NTLKK01 | 504H | 12 | 4:1 | 2:1 | PVA | 2% | — | — | — | 65–140 | 9,9–11,0 | — |
| 230110NTLKK02 | 504H | 36 | 4:1 | 2:1 | PVA | 2% | — | — | — | 73 ± 5 | 9,1 ± 2,2 | — |
| 230110NTLKK03 | 504H | 72 | 4:1 | 2:1 | PVA | 2% | — | — | — | 83 ± 3,5 | 7,6 ± 3,2 | — |
| 230110NTLKK04 | 504H | 100 | 4:1 | 2:1 | PVA | 2% | — | — | — | 152 ± 16 | 8,1 ± 3,5 | — |
| **Comparaison grades PLGA 502H vs 504H (100 mg/mL, PVA 2%, PA2/E1 = 2:1, PO/PA1 = 3:2)** | | | | | | | | | | | | |
| 230126NTLKK01 | 502H | 70 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | — | — | 104 ± 12 | 9,2 ± 1,8 | — |
| 230126NTLKK02 | 502H | 85 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | — | — | 101 ± 3 | 10,7 ± 1,1 | — |
| 230126NTLKK03 | 502H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | — | — | 106 ± 10 | 10,8 ± 3,9 | — |
| 230126NTLKK04 | 504H | 70 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | — | — | 97 ± 2 | 11,8 ± 0,3 | — |
| 230126NTLKK05 | 504H | 85 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | — | — | 104 ± 7 | 9,9 ± 1,6 | — |
| 230118NTLKK01 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | — | — | 105 ± 6 | 9,9 ± 5,7 | — |
| 230117NTLKK01 | 502H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | — | — | 90 ± 6 | 8,6 ± 3,4 | — |
| **Comparaison des stabilisants (PLGA 100 mg/mL, PA2/E1 = 2:1)** | | | | | | | | | | | | |
| 230426NTLKK01 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | — | — | 104 ± 3 | 9 ± 2 | — |
| 230426NTLKK02 | 504H | 100 | 2:1 | 10:1 | PVA | 2% | — | — | — | 119 ± 9 | 9 ± 4 | — |
| 230426NTLKK03 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | P188 | 2% | — | — | — | 119 ± 16 | 9 ± 3 | — |
| 230426NTLKK04 | 502H | 100 | 2:1 | 10:1 | P188 | 2% | — | — | — | 90 ± 8 | 11 ± 2 | — |
| 230426NTLKK05 | 502H | 100 | 2:1 | 3:2 | Cholate Na | 2% | — | — | — | 123 ± 3 | 9 ± 2 | — |
| 230426NTLKK06 | 502H | 100 | 2:1 | 10:1 | Cholate Na | 2% | — | — | — | 134 ± 10 | 10 ± 2 | — |
| **Encapsulation du trastuzumab et amélioration des ratios et de la quantité introduite (PLGA 504H, 100 mg/mL, PVA 2%)** | | | | | | | | | | | | |
| T16 | 504H | 100 | 3:1 | 3:1 | PVA | 2% | — | 5,69 | 1 mg | 101 ± 2 | 11,3 ± 0,6 | 39 |
| T18 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | 5,69 | 2 mg | 98 ± 2 | 12 ± 0 | 24 |
| 230105NTLKK01 | 504H | 100 | 10:1 | 2:1 | PVA | 2% | — | 12,1 | 1 mg | 117 ± 6 | 9 ± 2 | 35 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 230105NTLKK02 | 504H | 100 | 10:1 | 2:1 | PVA | 2% | — | 12,1 | 1 mg | 105 ± 11 | 9 ± 3 | 31 |
| 230131NTLKK02 | 504H | 100 | 5:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | — | — | 104 ± 3 | 9,1 ± 2,5 | 32 |
| 230220NTLKK01 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | 2,18 | 1 mg | 102 ± 4 | 10 ± 2 | 59 |
| 230220NTLKK02 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | 2,18 | 1 mg | 103 ± 4 | 9,6 ± 1,8 | 66 |
| 230220NTLKK03 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | 2,18 | 1 mg | 102 ± 6 | 9,6 ± 2,4 | 51 |
| 230306NTLKK01 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | 2,18 | 1 mg | 108 ± 5 | 10 ± 3 | 42 |
| 230306NTLKK02 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | 2,18 | 1 mg | 99 ± 2 | 11 ± 1 | 64 |
| 230306NTLKK03 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | 2,18 | 1 mg | 103 ± 5 | 8 ± 4 | 62 |
| 241204NTLK06 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | 3,5 | 1 mg | 100 ± 12 | 9 ± 1 | 76 |
| 241204NTLK07 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | - | - | 97 ± 6 | 8 ± 2 | - |
| 241204NTLK02 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | 3,5 | 1 mg | 97 ± 6 | 8 ± 2 | 69 |
| 250527NT-LKK01 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | - | 1 mg | 86 ± 4 | 8 ± 4 | _ |
| 250527NT-LKK03 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | 12 | 1 mg | 84 ± 4 | 8 ± 2 | 69 |
| 250603 NTLK02 | 504H | 100 | 2:1 | 3:2 | PVA | 2% | — | 6,8 | 1 mg | 86 ± 2 | 9 ± 1 | 62 |

PA2 : phase aqueuse externe · E1 : émulsion primaire · PO : phase organique · PA1 : phase aqueuse interne · CS : chitosane · ET : écart-type · — : non applicable ou non mesuré · n = 3 pour toutes les formulations sauf indication contraire.

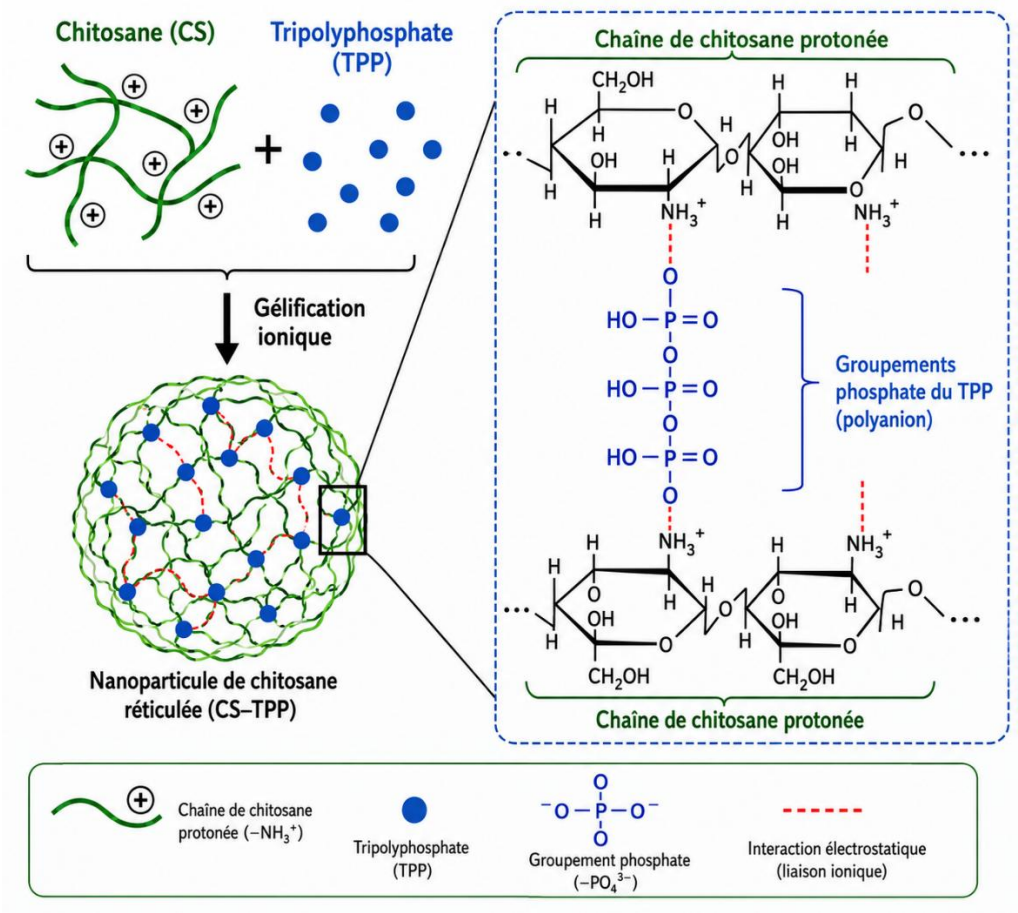



**Figure supplémentaire 1**: **Mécanisme de formation des nanoparticules de chitosane (NPsCS) par gélification ionique**. Le chitosane (CS) est un polymère naturel biocompatible issu de la désacétylation partielle de la chitine extraite de carapaces de crustacés. En milieu acide (pH 5), les groupements amine du CS sont protonés en groupements ammonium ($–NH_3^+$), conférant au polymère une charge de surface positive. La formation de nanoparticules repose sur l'interaction électrostatique spontanée entre ces groupements $–NH_3^+$ et les groupements phosphate ($–PO_4^{3–}$) du tripolyphosphate de sodium (TPP), un agent de réticulation polyanionique. Ces liaisons ioniques intra- et intermoléculaires induisent l'auto-assemblage des chaînes de CS autour des ions TPP, conduisant à la formation de nanoparticules sphériques dotées d'une charge de surface positive nette, ce qui engendre le potentiel zêta positif caractéristique de ce système. L'encart structurel illustre, à l'échelle moléculaire, les interactions électrostatiques (lignes rouges en pointillés) établies entre les groupements $–NH_3^+$ de deux chaînes de CS protonées et les groupements phosphate du TPP (en bleu). La taille des nanoparticules obtenues est inversement proportionnelle à la masse molaire du CS utilisé.

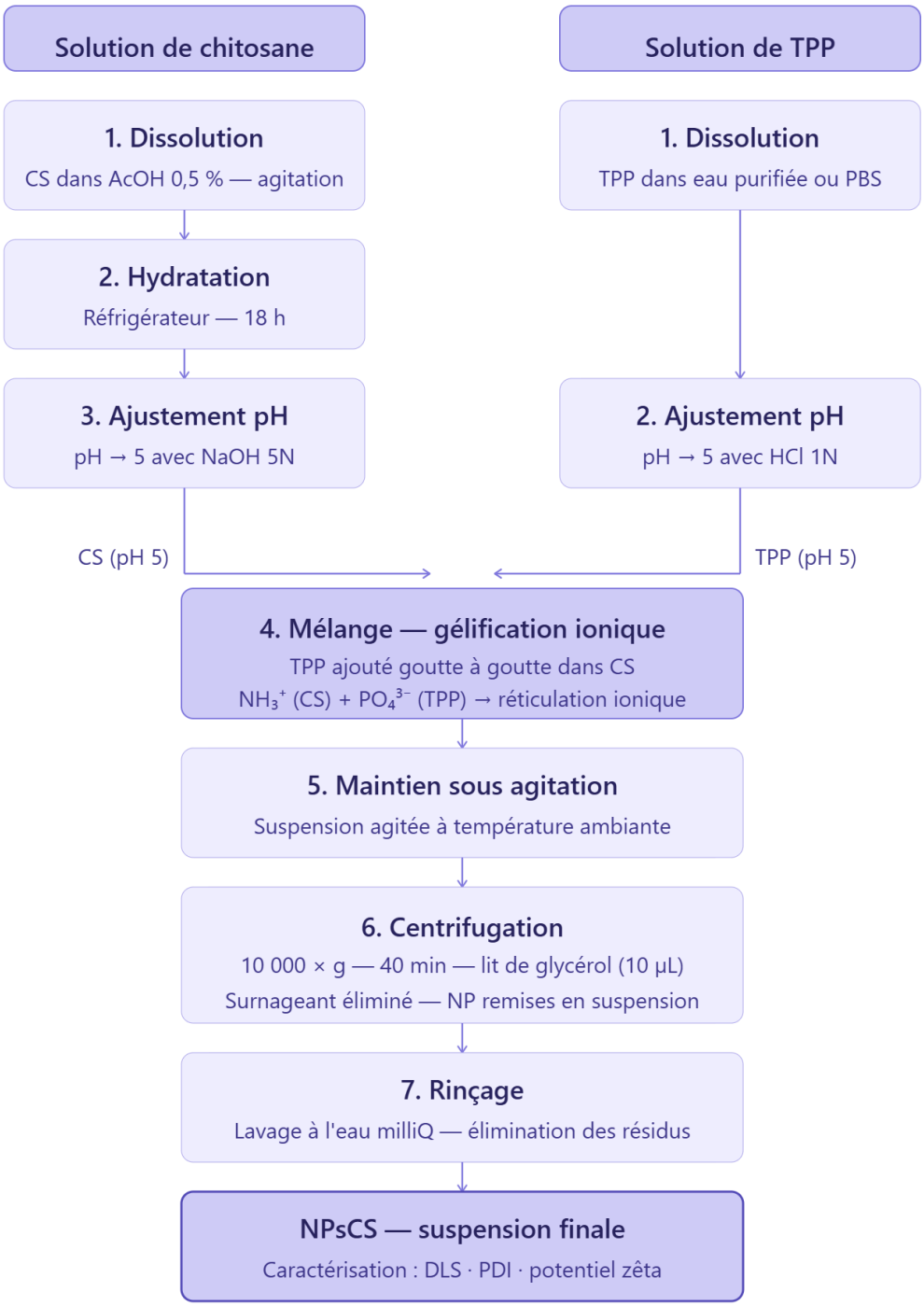
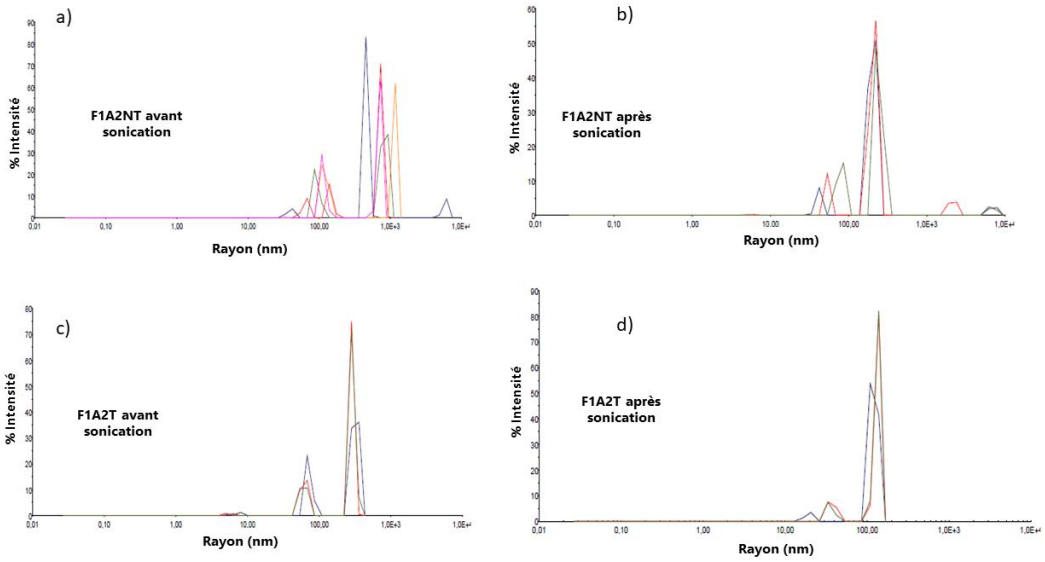



**Figure supplémentaire 2** : **Schéma du protocole de préparation des nanoparticules de chitosane (NPsCS) par gélification ionique.** Les solutions de CS et de TPP sont préparées séparément à diverses concentrations et rapports molaires, et leur pH respectif est ajusté à 5 avant le mélange afin d'éviter la précipitation du CS en milieu basique. La solution de TPP est ensuite ajoutée goutte à goutte à la solution de CS sous agitation magnétique à température ambiante. Une étape de sonication post-formulation a été testée pour réduire la taille des particules et améliorer l'homogénéité de la distribution granulométrique. Les nanoparticules sont concentrées par centrifugation sur un coussin de glycérol (10 000 × g, 40 min), rincées à l'eau Milli-Q, puis caractérisées par diffusion dynamique de la lumière (DLS : taille, PDI) et par mesure du potentiel zêta.




| Code Formulation d'origine | Sans sonication | Avec sonication |
|---|---|---|
| | Rayon (nm) | Rayon (nm) |
| Formulations sans ajustement de pH (NT) | | |
| 190821F1A1 NT | 4040 ± 1698 | 271 ± 14 |
| 190821F1A2 NT | 676± 197 | 218 ± 21 |
| Formulations avec ajustement de pH (T) | | |
| 190821F1A1 T | 1507± 345 | 164 ± 27 |
| 190821F1A2 T | 324± 42 | 132 ± 8 |
| 190821F1A3 T | 972± 292 | 171 ± 7 |
| 190821F2A2 T | 1137± 385 | 156 ± 23 |
| 190821F2A3 T | 481± 175 | 148 ± 9 |

NT : sans ajustement de pH préalable · T : avec ajustement de pH à 5  : écart-type · n = 3

**Figure supplémentaire 3** : **Caractérisation par DLS des nanoparticules de chitosane dans différentes conditions de formulation**. Distributions de taille obtenues par DLS pour les formulations sans ajustement de pH (NT) et avec ajustement de pH à 5 (T), avant et après étape de sonication post-formulation. (a) Formulation F1A2NT avant sonication montre une distribution multimodale et hétérogène, révélatrice d'une précipitation partielle du CS en milieu basique. (b) Formulation F1A2NT après sonication montrant une distribution plus homogène. (c) Formulation F1A2T avant sonication montrant une distribution bimodale avec présence d'une population résiduelle de grande taille. (d) Formulation F1A2T après sonication montrant une distribution plus étroite, montrant que la sonication améliore homogénéité ou diminue la taille des agrégats de la suspension de Np. Le tableau récapitulatif présente les rayons hydrodynamiques moyens (nm ± écart-type, n = 3) de l'ensemble des formulations testées, avec et sans sonication. L'ajustement du pH préalable au mélange CS/TPP et l'étape de sonication apparaissent comme des paramètres critiques pour l'obtention de nanoparticules de taille réduite et de distribution homogène. NT : sans ajustement de pH préalable ; T : avec ajustement de pH à 5.

# II. EVALUATION *IN VITRO* (ARTICLE PUBLIE DANS PHARMACEUTICS MAI 2025)

## A. INTRODUCTION

Une fois la formulation sélectionnée, l'étape suivante a consisté à évaluer son comportement sur un modèle *in vitro*. Avant d'envisager tout étude de perméabilité, il nous a paru indispensable d'assurer l'innocuité de nos formulations vis-à-vis de l'épithélium nasales, puis d'évaluer leur capacité à franchir la barrière épithéliale. Comme présenté dans l'introduction générale, plusieurs modèles expérimentaux sont disponibles pour étudier le transport de molécules à travers l'épithélium nasal dans le cadre de l'administration N2B. Parmi ces modèles, on trouve régulièrement des modèles *ex vivo dont* ceux utilisant de l'épithélium olfactif porcin monté dans une cellule de diffusion de Franz et des modèles *in vitro* faits à base de lignées cellulaires immortalisées, telles que les cellules RPMI 2650.

Nous avons choisi le modèle RPMI 2650 pour cette étude. Ce modèle a déjà été validé au laboratoire pour l'évaluation de formulations destinées à l'administration nasale. Les cellules RPMI 2650 sont des cellules épithéliales immortalisées dérivées d'un carcinome du septum nasal humain. Ces cellules sont largement utilisées pour évaluer la sécurité et la perméabilité de formulations administrées par voie nasale.

Afin d'obtenir un modèle reproduisant les propriétés de barrière de l'épithélium nasal, les cellules ont été cultivées à l'interface air-liquide (ALI). Cette méthode de culture est essentielle pour favoriser la différenciation cellulaire et la formation d'un épithélium présentant des caractéristiques proches à celles de la muqueuse nasale. Dans ces conditions, les cellules développent des jonctions serrées comparables à celles observées dans l'épithélium nasal *ex vivo*, tout en conservant leur capacité à produire du mucus.

Bien que ce modèle ne reproduise pas l'ensemble des types cellulaires présents dans l'épithélium nasal comme les cellules neuronales olfactives et les cellules ciliées, il constitue un modèle pertinent pour étudier les effets des formulations sur la muqueuse nasale ainsi que leur transport à travers la barrière épithéliale. Une partie des travaux présentés dans cette section a été publiée dans la revue Pharmaceutics (Kengne Kamkui et al., 2025) [170] et reproduite en annexe 2. Les résultats concernant le modèle d'épithélium nasal sont repris ici afin d'assurer la continuité de la présentation de cette thèse. Les tests réalisés sur un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique, également décrits dans cette publication, ne sont pas détaillés dans cette thèse.

# B. MATERIELS ET METHODES

## B.1 Culture des cellules RPMI2650

Les cellules RPMI 2650 (ECACC, Sigma-Aldrich, États-Unis) ont été cultivées dans des flaques de culture en polystyrène de 25 $cm^2$ à 37 °C, 5 % de $CO_2$. Le milieu de culture était constitué de milieu MEM contenant du rouge de phénol, supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur, 1 % de pénicilline/streptomycine, 1 % de L-glutamine et 1 % d'acides aminés non essentiels (NEAA). Le milieu était renouvelé tous les deux à trois jours. Lorsque les cellules atteignaient environ 80 % de confluence, elles étaient détachées par trypsinisation puis ensemencées sur des inserts de culture.

## B.2 Mise en place du modèle *in vitro* de l'épithélium nasal

Avant l'ensemencement cellulaire, les inserts perméables Thincert® (Greiner Bio-One ; format 12 puits, membrane en PET, taille de pore de 1 µm) ont été revêtus d'une solution de collagène à 0,5 mg/mL pendant 2 heures à 37 °C (100 rpm) afin de former une matrice extracellulaire favorisant l'adhésion et la prolifération des cellules RPMI 2650. Après avoir vidé l'excédent, les cellules ont été ensemencées sur les inserts pré-revêtus à une densité de $5 \times 10^5$ cellules/$cm^2$ dans 500µL de milieu en apicale et suivi de 1,5 ml de milieu dans le compartiment basolatéral.

À la suite de l'ensemencement, les cellules ont été cultivées en immersion pendant 48 heures. Les inserts ont ensuite été placés à l'interface ALI en retirant le milieu dans le compartiment apical et maintenant que celui du compartiment basolatéral. L'ensemble était ensuite maintenu dans ces conditions pendant 15 jours (en moyenne) supplémentaires, le milieu de culture étant renouvelé tous les deux ou trois jours uniquement au niveau du compartiment basolatéral.

## B.3 Caractérisation et validation du modèle

L'intégrité et la fonctionnalité de la barrière épithéliale ont été évaluées au cours du temps à l'aide de plusieurs approches complémentaires.

La résistance électrique transépithéliale (TEER) a été mesurée aux jours 5, 7, 12 et 14 à l'aide d'un volt-ohmmètre épithélial EVOM2® (World Precision Instruments, États-Unis). Pour chaque mesure, 500 µL de milieu de culture frais préchauffé ont été ajoutés dans le compartiment apical, et les cellules ont été laissées à stabiliser pendant au

moins 10 minutes avant la lecture afin de garantir des conditions d'équilibre reproductibles. Une valeur de TEER égale ou supérieure à 75 Ω/cm² était requise pour confirmer l'intégrité de la barrière et initier les expériences de perméabilité.

La perméabilité paracellulaire a été évaluée par le test au Lucifer Yellow ; ce marqueur fluorescent de faible poids moléculaire sert de traceur de l'intégrité jonctionnelle. Une diminution progressive de son passage au cours du temps témoigne de la formation et du renforcement des jonctions serrées intercellulaires.

La production de mucus a été visualisée par coloration au bleu Alcian (ThermoFisher Scientific, États-Unis), qui met en évidence les glycoprotéines acides constituant le mucus. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope optique (Olympus CKX41, Tokyo, Japon) équipé d'une caméra numérique (PixeLINK™, Canada).

## B.4 Etude de l'influence des formulations sur l'intégrité de la barrière et la viabilité cellulaire

L'impact des formulations sur l'intégrité de la barrière épithéliale a été évalué en mesurant la TEER avant et après l'exposition, selon le protocole décrit précédemment. La production de mucus a également été réévaluée après l'exposition par coloration au bleu Alcian, afin de vérifier que les formulations n'avaient aucun effet délétère sur les propriétés sécrétoires de l'épithélium.

La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Après 60 minutes d'exposition aux différentes conditions de formulations testées, le milieu apical a été retiré et 150 µL d'une solution de MTT à 0,5 mg/mL dans du PBS ont été ajoutés dans chaque puits. Les cellules ont été incubées à 37 °C pendant 3 heures. Le surnageant a ensuite été éliminé et les cristaux de formazan ont été dissous par l'ajout de 400 µL de DMSO. L'absorbance a été mesurée à 590 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Spectramax). Le pourcentage de réduction du MTT a été calculé selon la formule suivante :

**% réduction MTT = (Absorbance des cellules traitées / Absorbance du contrôle PBS) × 100**

## B.5 Etude de perméabilité

Des expériences de perméabilité ont été réalisées entre les jours 12 et 15 de culture à l'interface ALI, sur des inserts dont l'intégrité de la barrière épithéliale avait été préalablement validée par une valeur de TEER supérieure ou égale à 75 Ω/cm². Les

formulations testées, à savoir des nanoparticules chargées en trastuzumab (NP-TZB) et du trastuzumab libre (F-TZB), préparés à diverses concentrations dans du PBS, ont été appliquées dans le compartiment apical des inserts (100 µL), puis incubées pendant 60 minutes à 37 °C, en condition de culture 5 % de $CO_2$ sous agitation. Après cette incubation, la surface apicale des inserts a été rincée trois fois avec 300 µL de PBS afin d'éliminer toute trace de TZB restant à la surface des cellules.

Des échantillons de 500 µL ont été prélevés dans le compartiment basolatéral à 1, 5 et 24 heures après le début de l'exposition. Les volumes retirés aux temps 1 heure et 5 heures ont été intégralement remplacés par un volume équivalent de milieu frais préchauffé, afin de maintenir des conditions sink et d'assurer la continuité du gradient de diffusion. Tous les échantillons prélevés ont été analysés par ELISA pour quantifier la concentration de TZB ayant traversé la barrière épithéliale. Ces mêmes échantillons ont également été analysés par cytométrie en flux, selon le protocole décrit dans les sections précédentes, afin de vérifier que le TZB ayant traversé la barrière épithéliale conservait sa capacité à se lier au récepteur HER2 des cellules BT474 HER2-positives.

# C. RESULTATS

## C.1 Évaluation de l’influence de la formulation sur l'intégrité de l’épithélium nasal

Avant d'évaluer la pénétration du trastuzumab à travers le modèle d'épithélium nasal, il était nécessaire de s’assurer que les différentes formulations n'altéraient pas les propriétés de la barrière. Ainsi, l'effet du trastuzumab libre (F-TZB), des nanoparticules vides (NP) et des nanoparticules chargées en trastuzumab (NP-TZB) a été évalué à deux concentrations de TZB (350 nM, C1 et 700 nM, C2) sur l'intégrité de la barrière, la viabilité cellulaire et la production de mucus. Les mesures de résistance électrique transépithéliale (TEER), réalisées avant et après exposition, n'ont montré aucune diminution significative de l'intégrité de la barrière, quelle que soit la formulation testée, contrairement au contrôle positif (DMSO) qui a entraîné une forte diminution de la TEER (Figure 36b). La coloration au bleu alcian, effectuée une heure après l'exposition à la concentration la plus élevée (700 nM), a révélé une distribution homogène du mucus à la surface épithéliale dans les groupes PBS, TZB libre, NP vide et NP-TZB, comparable à celle observée avant traitement. En revanche, le contrôle positif traité au DMSO a montré une altération significative de la couche de mucus (Figure 36c-g).

Enfin, le test de viabilité cellulaire MTT n'a révélé aucune cytotoxicité significative induite par les nanoparticules, le trastuzumab libre ou les nanoparticules chargées en trastuzumab, quelle que soit la concentration étudiée. La viabilité cellulaire est restée comparable à celle du contrôle négatif (PBS) dans toutes les conditions expérimentales (Figure 36a).

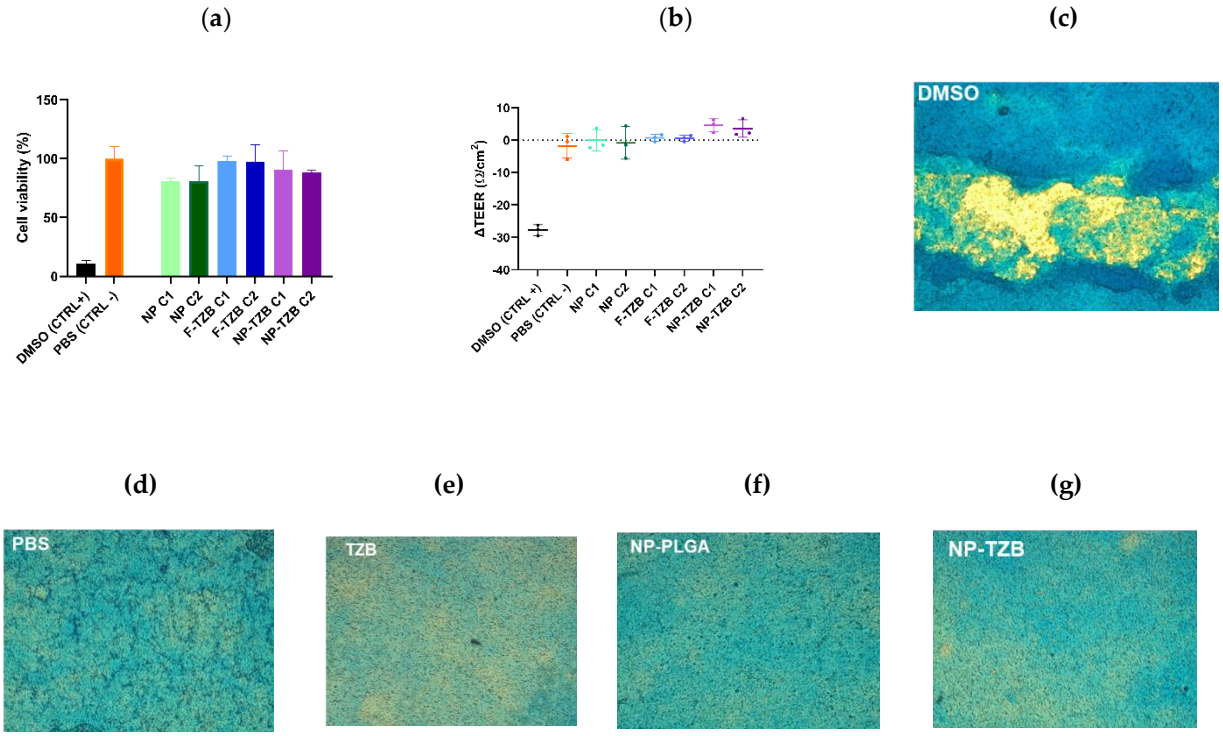



**Figure 36 : Impact de la formulation à des concentrations de 350 nM (C1) et 700 nM (C2) sur l'intégrité de la barrière, la fonctionnalité cellulaire et la viabilité cellulaire.** (a) Pourcentage de viabilité cellulaire après exposition aux différentes conditions (DMSO et PBS utilisés comme témoins positif et négatif, respectivement). (b) Variation de la résistance électrique transépithéliale (ΔTEER) avant et après exposition. (c-g) Marquage au bleu alcian illustrant la distribution du mucus à la surface épithéliale pour le DMSO (c), le PBS (d), le TZB libre (e), les nanoparticules NP-PLGA vides (f) et les nanoparticules NP-TZB chargées (g).

## C.2. Évaluation de la perméabilité du trastuzumab à travers le modèle d'épithélium nasal

Après avoir vérifié que les formulations n'altéraient pas l'intégrité de l'épithélium nasal sur le modèle RPMI 2650, leur capacité à améliorer le passage du trastuzumab à travers l'épithélium nasal a été évaluée à l'aide du modèle ALI-RPMI 2650. Le F-TZB et le NP-TZB ont été testés à deux concentrations (150 nM et 700 nM), et la quantité de TZB ayant traversé l'épithélium a été mesurée dans le compartiment basal après 1 h, 5 h et 24 h (Figure 37).

Quelle que soit la formulation, seule une faible quantité de TZB non formulé a été détectée dans le compartiment basal après 1 h d'exposition. À une concentration de 150 nM, le trastuzumab libre est resté indétectable à 1 h et 5 h, tandis qu'une faible quantité de NP-TZB était déjà quantifiable (Figure 37a). L'augmentation de la concentration apicale à 700 nM a entraîné une augmentation des quantités retrouvées dans le compartiment basal montrant un passage concentration dépendante du TZB à

travers l'épithélium, aussi bien pour le trastuzumab libre que pour sa forme associée aux nanoparticules de PLGA (Figure 37b). Dans les deux cas, cette quantité de TZB détectée dans le compartiment basal a également augmenté avec le temps d'exposition.

Après 24 h, les différences entre les formes libres et formulées étaient plus marquées. À 700 nM, la quantité de trastuzumab détectée dans le compartiment basal a atteint 16,55 ± 2,02 nmol pour le NP-TZB, contre 1,69 ± 0,19 nmol pour le F-TZB, soit une augmentation d'environ neuf fois du transport transépithélial.

En résumé, ces résultats démontrent que le transport du trastuzumab à travers le modèle d'épithélium nasal dépend à la fois de la quantité appliquée et du temps d'exposition. Ils mettent en exergue également l'avantage de l'encapsulation dans des nanoparticules de PLGA pour améliorer significativement la perméabilité du trastuzumab par rapport à l'anticorps libre.

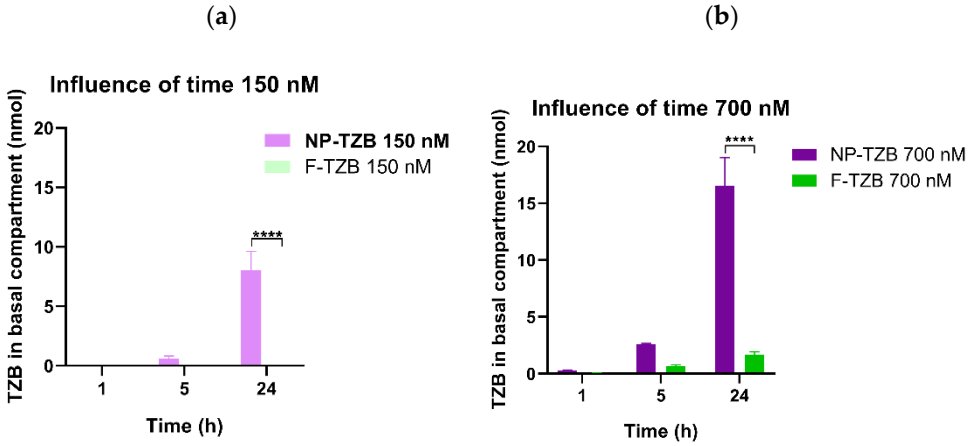



**Figure 37 : Transport du NP-TZB et du F-TZB au cours du temps à travers un modèle d'épithélium nasal RPMI 2650 à différentes concentrations d'exposition**. Les cellules ont été exposées pendant 1 h à deux concentrations de TZB (150 nM et 700 nM), sous forme de NP-TZB ou de F-TZB, dans le compartiment apical. La quantification du TZB dans le compartiment basal a été réalisée 1 h, 5 h et 24 h après le traitement apical. (a) Transport à 150 nM. (b) Transport à 700 nM. Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± écart-type, issues de trois expériences indépendantes (n = 3). Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA à deux facteurs (temps et concentration), suivie d'un test post-hoc de Tukey pour les comparaisons multiples. * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; **** $p < 0,0001$.

## C.3 Évaluation de la fonctionnalité du trastuzumab après passage à travers l'épithélium nasal

Afin de vérifier que le trastuzumab conservait sa capacité à reconnaître son récepteur après son passage à travers l'épithélium nasal, des échantillons prélevés dans le compartiment basal après 24 h ont été analysés par cytométrie en flux sur des cellules BT-474 surexprimant HER2. Une concentration intermédiaire de 350 nM a été ajoutée

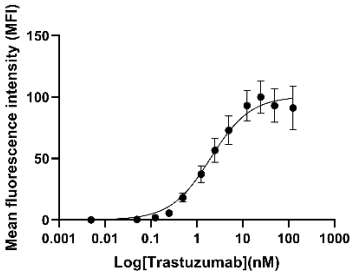
pour mieux évaluer l'influence de la dose sur la liaison du trastuzumab. Au préalable, une courbe de saturation a été établie avec le trastuzumab afin de valider le test de liaison sur les cellules BT-474. Comme illustré sur la figure 38a, l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) augmente avec la concentration de trastuzumab jusqu'à atteindre un plateau, confirmant ainsi la liaison spécifique du TZB au récepteur HER2.

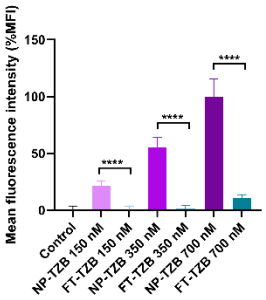
Les échantillons issus des tests de perméabilité ont ensuite été incubés avec des cellules BT-474. Pour toutes les concentrations étudiées, les échantillons issus de l'exposition aux de nanoparticules de PLGA chargées en trastuzumab ont montré des intensités de fluorescence significativement plus élevées que celles obtenues avec le trastuzumab libre (Figure 38b). Cette différence était particulièrement marquée à la concentration de 700 nM, où les cellules incubées avec les échantillons de NP-TZB présentaient une intensité de fluorescence moyenne de 45,98 ± 6,85, contre 6,14 ± 1,36 pour le trastuzumab libre (Figure 38c).

De plus, une augmentation progressive du signal de fluorescence a été observée avec l'augmentation de la concentration TZB pour les NP-TZB, indiquant une réponse dose-dépendante. À l'inverse, les échantillons de trastuzumab libre ont présenté de faibles intensités de fluorescence, proches de celles du contrôle négatif, quelle que soit la concentration testée.

Ces résultats sont en accord avec les données de perméabilité présentées dans la section précédente. Ils indiquent que la plus grande quantité de trastuzumab ayant traversé l'épithélium sous forme de NP-TZB conserve sa capacité à se lier au récepteur HER2 après son passage à travers le modèle d'épithélium nasal.

(a) (b) ©




| | MFI | SD |
|---|---|---|
| Control, PBS | 1,42 | 1,64 |
| NP-TZB 150nM | 10,96 | 1,99 |
| FT-TZB 150nM | 1,57 | 1,51 |
| NP-TZB 350nM | 25,94 | 4,11 |
| FT-TZB 350nM | 3,74 | 1,34 |
| NP-TZB 700nM | 45,98 | 6,85 |
| FT-TZB 700nM | 6,14 | 1,36 |

**Figure 38 : Analyse par cytométrie en flux de l'affinité de liaison du TZB ayant traversé la barrière muqueuse nasale (milieu RPMI 2650) aux cellules HER2-positives (BT474).** (a) Courbe de saturation de liaison du TZB. (b) Représentation graphique des valeurs MFI des cellules BT474 incubées *in vitro* avec des échantillons de TZB ayant traversé le milieu RPMI 2650. Les données sont exprimées en moyenne MFI ± écart-type (n=3), normalisées par rapport au signal du contrôle négatif (PBS, 0 %) et au signal maximal obtenu avec le NP-TZB à 700 nM (100 %). (c) Tableau récapitulatif des valeurs moyennes MFI et des écarts-types pour chaque condition testée.

# D. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Après avoir formulé le trastuzumab dans des nanoparticules de PLGA, nous avons évalué son passage à travers un modèle d'épithélium nasal humain (RPMI 2650) en comparant le trastuzumab libre à sa forme encapsulée. Ce modèle constitue une première étape de criblage, permettant d'étudier la perméabilité de la formulation tout en réduisant le recours aux expérimentations sur les animaux. Le trastuzumab libre a présenté une faible perméabilité à travers l'épithélium nasal. Cette observation était attendu du fait de sa masse moléculaire élevée (~150 kDa) et à son caractère hydrophile qui, limitent fortement sa diffusion à travers l'épithélium. Elle est également en accord avec les travaux de Ladel et al., qui ont rapporté une perméabilité aux IgG inférieure à 10 % dans le même modèle après 24 heures d'exposition [190].

En revanche, la formulation du trastuzumab dans des nanoparticules de PLGA a permis d'augmenter d'environ neuf fois son passage à travers l'épithélium nasal. Ces résultats concordent avec les données de la littérature, qui rapportent une amélioration de la perméabilité des macromolécules thérapeutiques après leur formulation dans des nanoparticules de PLGA. Par exemple, des nanoparticules de PLGA non fonctionnalisées ont permis d'un facteur d'environ quatre environ le transport de l'insuline à travers la muqueuse nasale ovine, tandis qu'un revêtement de chitosane l'a multiplié par seize environ.

Ce résultat confirme notre hypothèse selon laquelle la vectorisation du trastuzumab dans des nanoparticules polymériques constitue une stratégie efficace pour améliorer son transport à travers l'épithélium nasal. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer cette amélioration. Les nanoparticules protègent d'abord l'anticorps contre les enzymes présentes à la surface de l'épithélium. Elles modifient également les propriétés de surface. En effet, contrairement au trastuzumab libre, les nanoparticules de PLGA présentent une surface plus hydrophobe, pouvant favoriser les interactions avec les membranes cellulaires et leur internalisation par des mécanismes d'endocytose non spécifiques, tels que les voies dépendantes de la clathrine, de la cavéoline ou de la macropinocytose. Ces mécanismes sont bien décrits pour les nanoparticules polymériques et pourraient contribuer à l'augmentation du transport observée.

De plus, l'analyse fonctionnelle des échantillons prélevés dans le compartiment basal confirme que le trastuzumab, après avoir traversé l'épithélium, conserve sa capacité à reconnaître le récepteur HER2. Les échantillons contenant les nanoparticules génèrent une intensité de fluorescence significativement plus élevée que celle obtenue avec le trastuzumab libre, ce qui concorde avec les résultats de perméabilité. Ces observations

indiquent que l'augmentation du passage s'accompagne d'une préservation de la fonctionnalité de l'anticorps.

Les tests de viabilité cellulaire, les mesures de TEER et la coloration au bleu alcian montrent également que les formulations développées ne compromettent ni l'intégrité de l'épithélium ni la production de mucus dans les conditions expérimentales étudiées. Ces résultats apportent des preuves préliminaires de la biocompatibilité de cette formulation pour l'administration nasale.

Ces résultats ont apporté une première preuve de concept pour cette stratégie et justifient une évaluation *in vivo* plus approfondie. Cependant, avant de mener ces études, une limitation importante a dû être surmontée. En effet, bien que la formulation initiale ait montré un passage amélioré du trastuzumab à travers l'épithélium nasal, sa capacité de chargement (LD%) restait faible. La quantité de nanoparticules nécessaire pour administrer une dose thérapeutique de trastuzumab aurait donc nécessité un volume supérieur à celui recommandé pour l'administration intranasale chez la souris. Il était par conséquent nécessaire d'améliorer la formulation afin d'augmenter la LD% et de réduire le volume à administrer. Cette étape d'optimisation est présentée dans la section suivante.

# III. ETUDES COMPLEMENTAIRES DE FORMULATION

## A. INTRODUCTION

Les résultats obtenus lors de la phase initiale de développement de la formulation ont permis d'identifier une formulation candidate de nanoparticules de PLGA chargées en trastuzumab. Cette formulation présentait des caractéristiques physico-chimiques satisfaisantes en termes de taille, d'efficacité d'encapsulation (EE %) et d'intégrité de l'anticorps libéré. Cela nous a permis de mener des études de perméabilité sur le modèle *in vitro* de l'épithélium nasal humain. Ces études ont mis en évidence une amélioration significative du transport du TZB. Toutefois, la capacité de chargement de TZB dans les nanoparticules (DL % = 1,14 ± 0,34 %) étant assez faible reste un facteur limitant, car cela pourrait nécessiter une application de grand volume ou des suspensions très concentrées de nanoparticules difficile à appliquer à l'échelle *in vivo*. Dans cette optique, il nous a paru nécessaire de faire une amélioration supplémentaire de la formulation afin d'augmenter la charge en TZB par unité de masse de nanoparticules, sans pour autant compromettre les propriétés physico-chimiques du système.

Deux stratégies complémentaires ont été explorées en parallèle. La première consistait à optimiser des paramètres de formulation clés susceptibles d'influencer le taux d'encapsulation (EE %) et le taux de chargement (DL %) tels que la concentration en polymère et le type de stabilisant pour la phase aqueuse externe. Ces facteurs ont été identifiés sur la base de données de la littérature et des résultats préliminaires obtenus lors de la première phase. La seconde stratégie reposait sur l'utilisation du fragment d'anticorps (Fab-TZB) dont la masse moléculaire est trois fois plus petite que le TZB entier (50 kDa contre 150 kDa), afin de favoriser une encapsulation plus efficace au sein de la matrice polymère tout en préservant la capacité de liaison au récepteur HER2. L'encapsulation de protéines dont le poids moléculaire est comparable à celui du fragment Fab-TZB, telles que l'albumine (≈ 66 kDa), a permis d'obtenir des taux de charge en masse (DL%) de molécule active de 7,3 % à 9,5 % dans des nanoparticules de PLGA. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait être possible d'augmenter l'efficacité de chargement du fragment Fab-TZB, bien que d'autres facteurs comme les propriétés physico-chimiques de la protéine et les conditions de formulation, jouent également un rôle [291].

Un intérêt particulier a été porté sur le poloxamère 188 (P188) comme stabilisant alternatif ou complémentaire au PVA. Le P188 est un copolymère tribloc non ionique composé d'un bloc central hydrophobe de poly(oxyde de propylène) entouré de deux blocs hydrophiles de poly(oxyde d'éthylène) (figure 39). Il est approuvé par la FDA sous

le nom commercial Lutrol® F68 [292]. Son mécanisme de stabilisation des nanoparticules de PLGA repose sur sa capacité à s'adsorber à la surface hydrophobe via son bloc poly(oxyde de propylène) formant une couche protectrice conférant une stabilisation stérique [293]. En plus de ce rôle, le P188 présente un avantage supplémentaire pour la délivrance au cerveau. En effet, il a été démontré que les nanoparticules enrobées de P188 peuvent adsorber l'apolipoprotéine E plasmatique et interagir avec les récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LDL) exprimés par les cellules endothéliales de la BHE, favorisant ainsi leur transcytose vers le parenchyme cérébral [294]. Le P188 pourrait également limiter l'efflux médié par la glycoprotéine P (P-gp), améliorant ainsi la biodistribution cérébrale des nanoparticules [295].

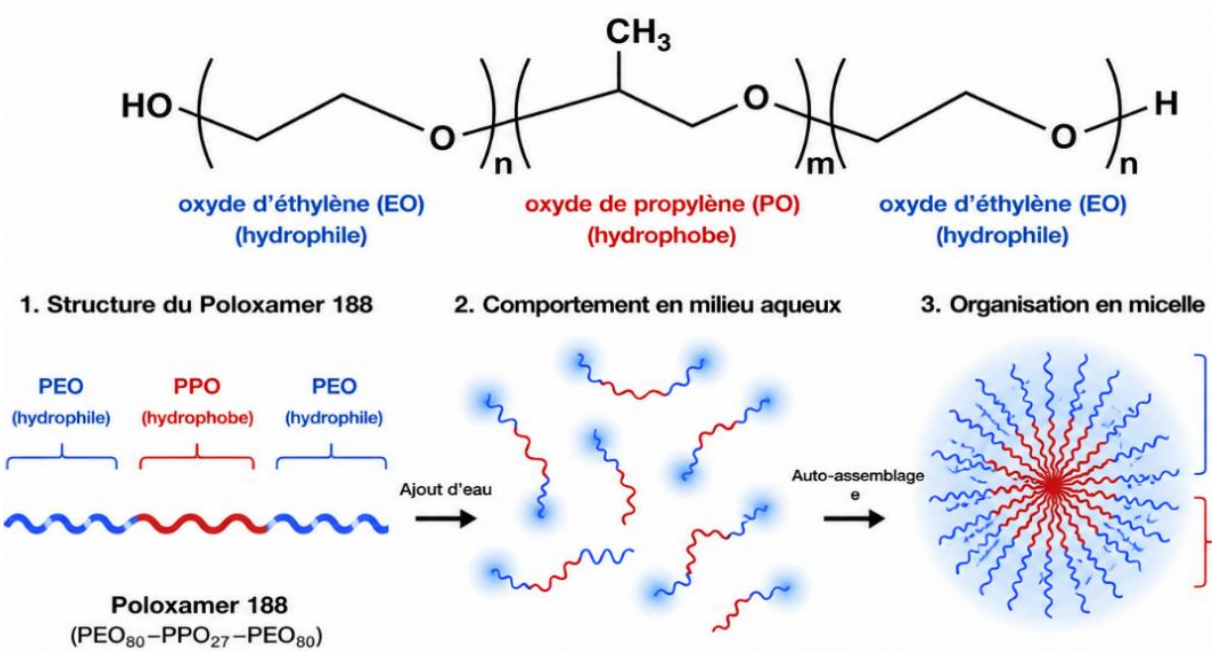



**Figure 39: structure du P188**

# B. MATERIELS ET METHODES

## B.1 Formulation des nanoparticules

Des nanoparticules de PLGA chargées en TZB ou en Fab-TZB ont été préparées selon le même protocole de double émulsion évaporation de solvant tel que décrit dans la section II. Un plan factoriel complet ($3^2$ = 9 expériences pour 2 facteurs à 3 niveaux) a été développé en faisant varier deux paramètres selon trois niveaux chacun (tableau 8) :

**Tableau 8 : Facteurs et niveaux du plan expérimental évalués pour l'optimisation de la formulation de nanoparticules de PLGA chargées en trastuzumab.**

| Facteurs | Niveaux | | |
|---|---|---|---|
| **Concentration de PLGA en mg/ml** | 25 | 60 | 100 |
| **Stabilisants** | PVA 2% | P188 2% | PVA1%+P188 1% |

Les paramètres maintenus constants pour toutes les expériences étaient les suivants (tableau 9) :

**Tableau 9 : Paramètres de formulation définis pour la préparation de nanoparticules de PLGA chargées en trastuzumab.**

| Facteurs | Niveaux |
|---|---|
| **Grade et poids moléculaire du PLGA** | 504H (MW ≈ 54 000 Da) |
| **Concentration du stabilisant total** | 2 % (m/v) |
| **Ratio PO/PA1** | 2 :1 |
| **Ratio PA2/E1** | 2 :1 |
| **Concentration en TZB (ou Fab-TZB)** | 6,8 mg/mL — 1 mg introduit |

L'étude a été menée en plusieurs étapes successives. Tout d'abord, l'influence de chaque type de stabilisant sur la taille des nanoparticules a été évaluée avant et après

purification. Ensuite, l'effet de l'encapsulation de la TZB sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules a été examiné. Enfin, l'influence combinée du type de stabilisant et de la concentration en PLGA sur la taille, l'efficacité d'encapsulation (EE %) et le taux de chargement en TZB (DL %) a été analysée afin d'identifier la formulation offrant le meilleur compromis entre ces paramètres.

Les réponses évaluées et les objectifs associés étaient les suivants (Tableau 10) :

**Tableau 10 : Réponses évaluées et objectifs d'optimisation pour la formulation de nanoparticules de PLGA chargées en trastuzumab.**

| Réponses évaluées | Objectifs |
|---|---|
| **Rayon hydrodynamique (nm)** | Minimiser (≤100 nm) |
| **Taux d'encapsulation (EE %)** | Maximiser |
| **Capacité de chargement (DL %)** | Maximiser |

## B.2 Etude de la cinétique de libération

Une étude de la cinétique de libération (150 h) a été réalisé afin d'évaluer et de comparer les profils de libération des différentes formulations. Les nanoparticules ont été mises en suspension dans du PBS à une concentration de 10 mg/mL, puis incubées à 37 °C sous agitation (1000 tr/min, Thermomixer). Des aliquotes ont été prélevées aux différents temps d'échantillonnage et remplacées par un volume équivalent de PBS afin de maintenir un volume constant. Les échantillons ont ensuite été analysés par ELISA, selon le protocole décrit dans la section II, et la quantité de TZB résiduel dans les nanoparticules a été déterminée par un dosage BCA après la lyse des nanoparticules, conformément aux recommandations du fabricant.

## B.3 Caractérisation physicochimique

Des analyses par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ont été réalisées afin d'étudier les interactions entre les constituants de la formulation ainsi que leur organisation à l'état solide.

### B.3.1 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC a été utilisée pour étudier le comportement thermique des différents constituants de la formulation ainsi que celui des nanoparticules de PLGA chargées en

TZB. Cette technique permet de déterminer la température de transition vitreuse (Tg) du polymère et d'évaluer l'effet de l'encapsulation du TZB ou de la nature du stabilisant sur les propriétés thermiques des nanoparticules. La Tg est un paramètre important, car elle peut influencer les propriétés mécaniques du polymère ainsi que la cinétique de libération du principe actif [296]. Des analyses ont été réalisées sur le PLGA, le PVA, le P188 et le TZB, ainsi que sur des nanoparticules de PLGA vides et chargées en TZB. Des formulations de nanoparticules préparées avec différents agents stabilisants de la phase aqueuse externe (PVA, P188 ou un mélange PVA/P188) ont également été étudiées.

Pour chaque échantillon, 2 à 10 mg de poudre ou de nanoparticules lyophilisées ont été placés dans un creuset en aluminium. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un calorimètre différentiel à balayage Jupiter STA 449 C (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Selb, Allemagne). Les échantillons ont été chauffés de 10 à 250 °C à une vitesse de 10 °C/min sous atmosphère d'azote (30 mL/min). Les thermogrammes obtenus ont été analysés afin d'identifier les Tg et d'évaluer les modifications induites par la formulation ou par l'ajout du TZB. Les données obtenues ont été analysées sur Excel.

### B.3.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été utilisée pour étudier les interactions moléculaires entre les différents composants de la formulation. Cette technique permet d'identifier les groupements fonctionnels clés et de détecter d'éventuelles modifications des bandes d'absorption caractéristiques, susceptibles de révéler des interactions entre le PLGA, les stabilisants (PVA et P188) et le TZB.

Les mêmes échantillons que ceux analysés par DSC ont été analysés à savoir le PLGA, le PVA, le Poloxamer 188 (P188) et le TZB, ainsi que des nanoparticules de PLGA blanche et chargées en TZB préparées avec différents stabilisants de la phase aqueuse externe (PVA, P188 ou un mélange PVA/P188). Les spectres FTIR ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Thermo Scientific™ Nicolet™ iS50 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis) piloté par le logiciel OMNIC. L'acquisition des données a été réalisée dans la gamme 400–4000 $cm^{-1}$, avec une résolution de 4 $cm^{-1}$ et 64 balayages par échantillon.

## B.4 Étude préliminaire de la stabilité du Fab-TZB

Avant d'entreprendre des essais de formulation pour le fragment Fab-TZB, une évaluation de sa stabilité a été réalisée dans des conditions de stress représentatives du procédé de formulation (sonication, interfaces, température). Cette étude a suivi la même approche que celle décrite pour le TZB entier dans la section I des résultats, incluant l'analyse des températures d'inflexion par Tycho et l'évaluation structurelle par SDS-PAGE.

# C. RESULTATS

## C.1 Formulation des TZB-NP : influence du type de stabilisant et de la concentration en PLGA sur la taille des nanoparticules

### C.1.1 Influence du type de stabilisant et du procédé de purification sur la taille des nanoparticules

Comme observé lors des essais préliminaires avec le cholate de sodium et le P188, le procédé de purification par centrifugation et lavage influence de manière significative la distribution de taille des nanoparticules. Afin de caractériser cet effet, la distribution de taille des nanoparticules préparées avec les trois stabilisants a été évaluée avant et après purification, en présence comme en l'absence de TZB.

Avant la purification, les résultats révèlent des comportements distincts selon le stabilisant utilisé. Avec le PVA à 2 % et le mélange PVA à 1 % + P188 à 1 %, les nanoparticules présentent des rayons hydrodynamiques nettement plus élevés avant le lavage qu'après, qu'elles soient vides ou chargées en TZB (figures 40a et 40b). Les profils de distribution correspondants (figures supplémentaires 4 et 6) montrent un décalage du pic vers des tailles plus faibles après le lavage, accompagné d'un resserrement de la distribution vers une population plus monodisperse, indépendamment de la présence de TZB. Aucune différence de taille significative n'est observée entre les nanoparticules vides et les NP-TZB dans ces deux conditions de stabilisation.

Le comportement de la formulation à 2 % de P188 s'est révélé significativement différent. Avant le lavage, les nanoparticules vides présentaient un rayon hydrodynamique étonnamment faible et monodisperse (87 ± 5 nm, PDI 9 ± 1 %), suggérant une stabilisation interfaciale efficace en l'absence d'anticorps. En revanche, en présence de TZB, les nanoparticules affichaient une distribution multimodale (figure supplémentaire 5) dès avant le lavage, caractérisée par une population majoritaire de grande taille (rayon moyen de 679 ± 5 nm) et une polydispersité marquée. Ce phénomène pourrait être lié à la nature protéique du TZB dont sa présence à la surface et au sein des nanoparticules modifie probablement le comportement interfacial du copolymère à tri-blocs, contribuant ainsi à l'augmentation de la taille des particules.

Après la purification, l'étape de lavage a un effet positif sur la taille et la distribution pour le mélange PVA à 2 % et PVA+P188, entraînant une réduction significative de la taille et une distribution plus étroite. En revanche, pour le P188 à 2 %, l'étape de centrifugation conduit à la formation d'un culot ou d'un précipité difficile à remettre en suspension de manière homogène (Figure 40c et Figure supplémentaire 5), ce qui

suggère la formation d'agrégats irréversibles induits mécaniquement lors de la centrifugation.

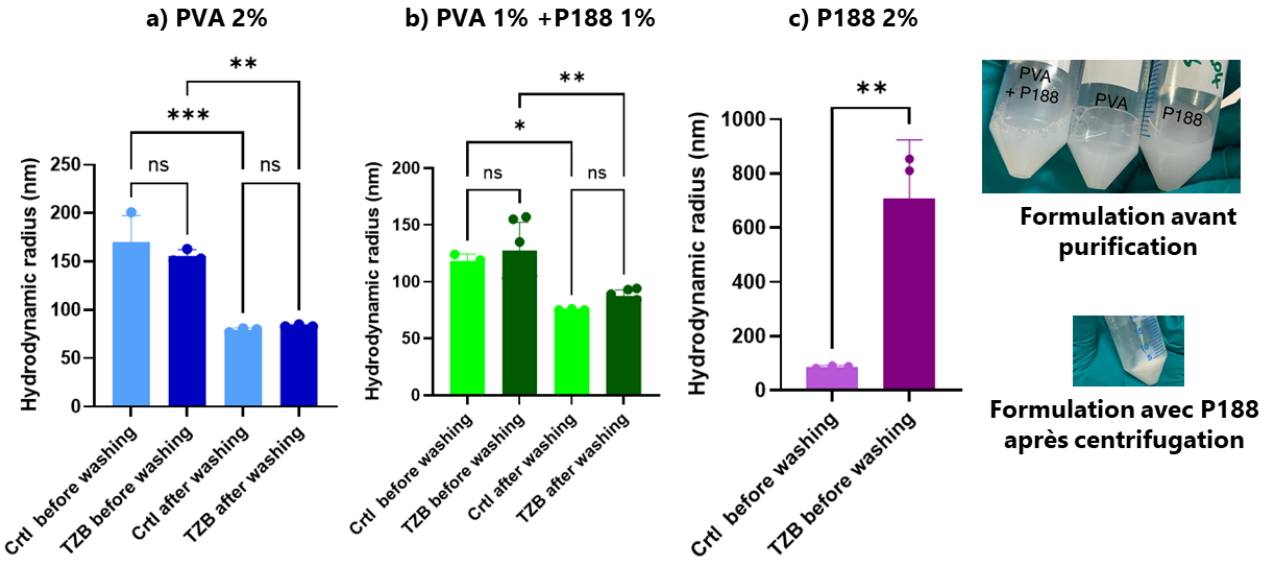



**Figure 40 : Influence du type de stabilisant et de l'incorporation de trastuzumab sur le rayon hydrodynamique des nanoparticules de PLGA 504H avant et après purification**. Rayon hydrodynamique moyen (nm) des nanoparticules vides (Ctrl) et chargées en trastuzumab (TZB) avant et après trois cycles de lavage par centrifugation-remise en suspension, pour les trois stabilisants testés : (a) PVA à 2 %, (b) mélange PVA à 1 % + P188 à 1 %, et (c) P188 à 2 %. Les photographies montrent l'aspect macroscopique des formulations avant purification (en haut à droite) et le culot obtenu après centrifugation des nanoparticules stabilisées au P188 à 2 % (en bas à droite), mettant en évidence la formation d'un précipité difficile à remettre en suspension. Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± écart-type (n = 3). Les comparaisons statistiques ont été réalisées à l'aide du test *post-hoc* de Tukey après une ANOVA : ns = non significatif · * p < 0,05 · ** p < 0,01 · *** p < 0,001. PLGA 504H · 100 mg/mL · PO/PA1 = 2:1 · PA2/E1 = 2:1.

### C.1.2 Caractérisation morphologique par microscopie électronique en transmission (MET)

Afin de déterminer la nature des particules observées après purification, à savoir s'il s'agissait d'agrégats de nanoparticules ou une augmentation intrinsèque de la taille des particules individuelles, une caractérisation par MET (microscopie électronique par transmission) a été réalisée (Figure 41). Les nanoparticules préparées avec du PVA à 2 % et avec le mélange PVA à 1 % / P188 à 1 % présentaient une morphologie sphérique, une surface lisse et une distribution homogène, en accord avec les données de DLS. En revanche, les nanoparticules préparées avec du P188 à 2 % seul ont révélé la présence d'agrégats ; cela confirme que la centrifugation induit des interactions inter-particulaires irréversibles lorsque ce stabilisant est utilisé seul, probablement en raison d'un phénomène de liaison des nanoparticules par les chaînes de P188 adsorbées à leur surface. La présence de PVA dans les formulations mixtes semble atténuer ces interactions et empêcher la formation de tels agrégats.

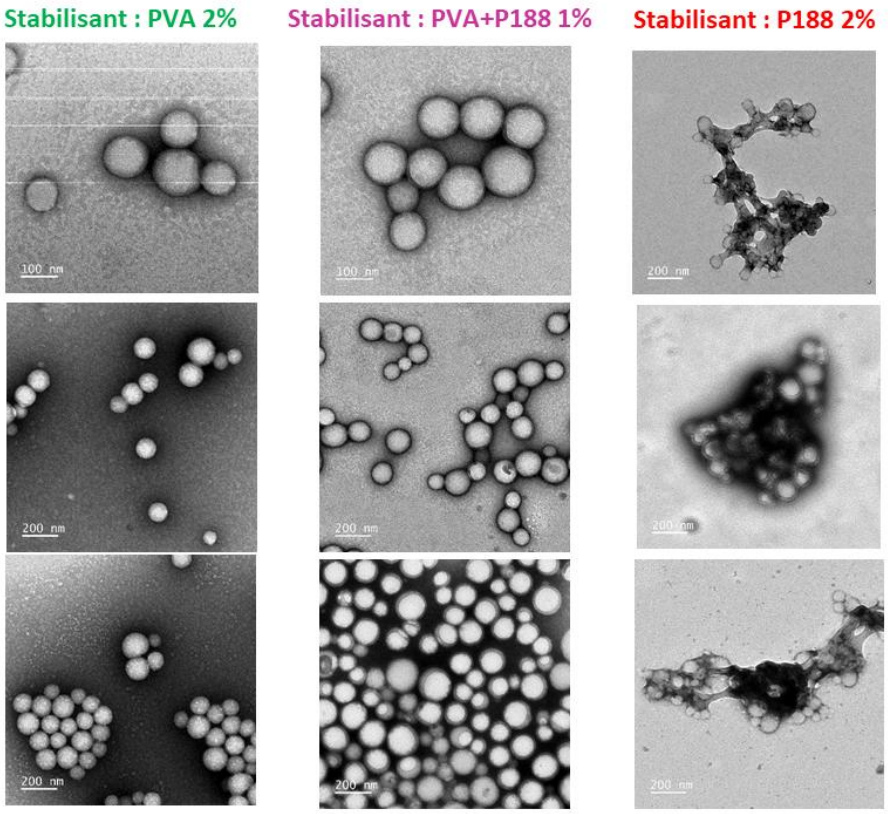



**Figure 41: Caractérisation morphologique de nanoparticules de PLGA 504H par microscopie électronique en transmission (MET) selon le type de stabilisant PVA, PVA+P188, P188. PLGA 504H · 100 mg/mL · TZB 1 mg**

Ces résultats montrent que l'étape de purification, essentielle pour éliminer l'excès de stabilisant et le TZB non encapsulé peut modifier de manière significative la taille des nanoparticules, selon le stabilisant utilisé.

### C.1.3 Influence du type de stabilisant et de la concentration de PLGA sur la distribution de taille des nanoparticules

L'effet de la concentration en PLGA sur le rayon hydrodynamique des nanoparticules dépend du stabilisant utilisé. Pour les nanoparticules stabilisées avec du P188 à 2 %, la concentration en PLGA n'a pas influencé de manière significative la taille. Des rayons hydrodynamiques élevés ainsi qu'une forte variabilité entre les formulations ont été observés aux trois concentrations testées (25, 60 et 100 mg/mL) (figure 42). Ces résultats indiquent que le phénomène d'agrégation est principalement lié au P188 plutôt qu'à la concentration en PLGA.

Avec le PVA à 2 % et le mélange PVA à 1 % + P188 à 1 %, la concentration en PLGA a une influence plus marquée sur la taille des nanoparticules. À 25 mg/mL, les rayons hydrodynamiques sont plus importants et plus variables qu'aux concentrations de 60 et 100 mg/mL (figure 42). Cette observation peut être liée au fait que la concentration

en PLGA influence directement la viscosité de la phase organique lors de la préparation de l'émulsion primaire. À de faibles concentrations, cette viscosité diminue et peut entraîner la coalescence des gouttelettes d'émulsion, provoquant ainsi l'augmentation observée de la taille et de l'hétérogénéité des particules. À cette concentration, le mélange PVA à 1 % + P188 à 1 % permet d'obtenir des nanoparticules légèrement plus petites qu'avec le PVA seul, ce qui suggère qu'une faible proportion de P188 améliore la stabilisation de l'émulsion lorsque la concentration en polymère est faible. Aux concentrations de 60 et 100 mg/mL, les deux stabilisants permettent d'obtenir des nanoparticules plus homogènes et reproductibles, avec des rayons hydrodynamiques inférieurs à 100 nm, répondant donc aux spécifications établies.

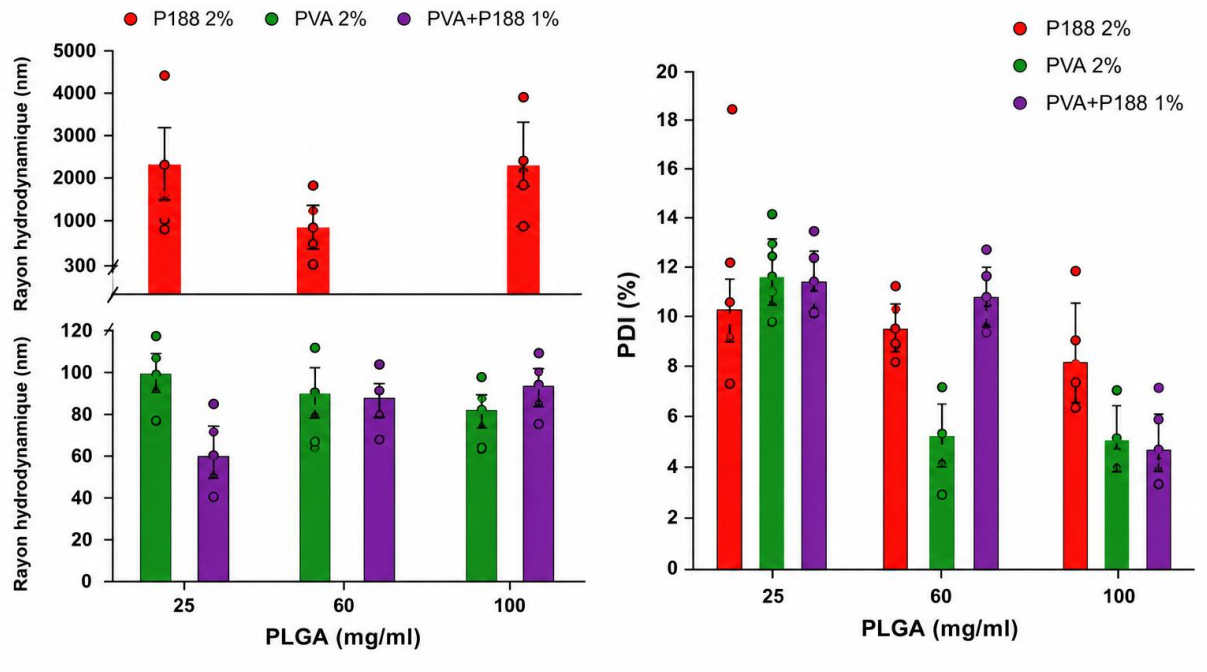



**Figure 42: Influence du type de stabilisant et de la concentration en PLGA (25, 60 et 100 mg/mL) sur le rayon hydrodynamique moyen et l'indice de polydispersité (PDI) de nanoparticules de PLGA 504H chargées en trastuzumab.**

## C.2 Formulation des TZB-NP : influence du type de stabilisant et de la concentration en PLGA sur l'efficacité d'encapsulation et le chargement en TZB des nanoparticules

Les formulations stabilisées uniquement par le P188 ont présenté les taux d'encapsulation les plus élevés, avec des valeurs d'EE % proches de 100 %, quelle que soit la concentration en PLGA (Figure 43a). En revanche, le DL % a diminué à mesure que la concentration en polymère augmentait, passant de 16,97 % à 25 mg/mL à 9,49

% à 60 mg/mL, puis à 7,44 % à 100 mg/mL (Figure 43b). Globalement, le taux de charge a diminué avec l'augmentation de la concentration en PLGA, quel que soit le stabilisant utilisé. Cette tendance était attendue, car l'augmentation de la quantité de polymère tout en maintenant constante la masse de trastuzumab introduite (1 mg), entraîne mécaniquement une baisse du DL %. Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature [297]. Les excellents taux d'encapsulation obtenus avec le P188 pourraient s'expliquer par la forte affinité du trastuzumab pour les interfaces revêtues de ce tensioactif, ce qui favorise son association aux nanoparticules plutôt que sa diffusion dans la phase aqueuse externe.

Avec 2 % de PVA, l'EE % a augmenté progressivement à mesure que la concentration en PLGA passait de 25 à 100 mg/mL (Figure 43a). Cette tendance suggère qu'une quantité plus importante de matrice polymère favorise l'encapsulation du trastuzumab. Toutefois, les formulations stabilisées uniquement par du PVA ont affiché les valeurs d'EE % et de DL % les plus faibles, avec une EE % comprise entre 18 % et 35 % et un DL d'environ 4,4 % à 25 mg/mL (Figures 43a et 43b). Le mélange 1 % PVA + 1 % P188 a permis d'obtenir des taux d'encapsulation élevés, atteignant jusqu'à 96 %, l'EE % augmentant avec la concentration en PLGA (Figure 43a). Les valeurs de DL sont restées dans une fourchette intermédiaire (3,3–10,2 %) (Figure 43b).

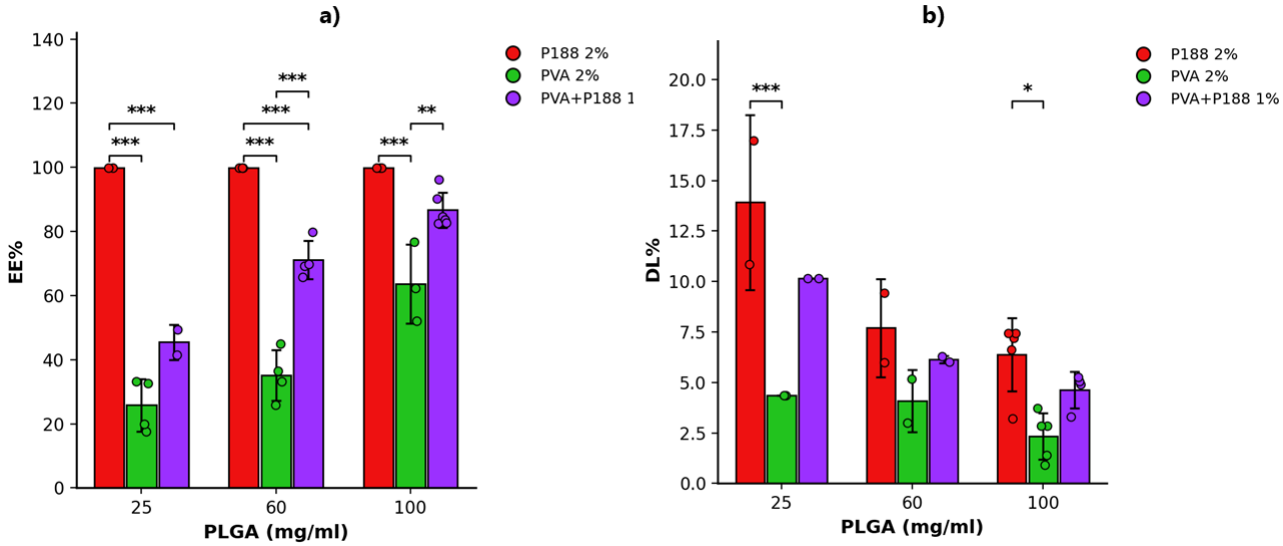


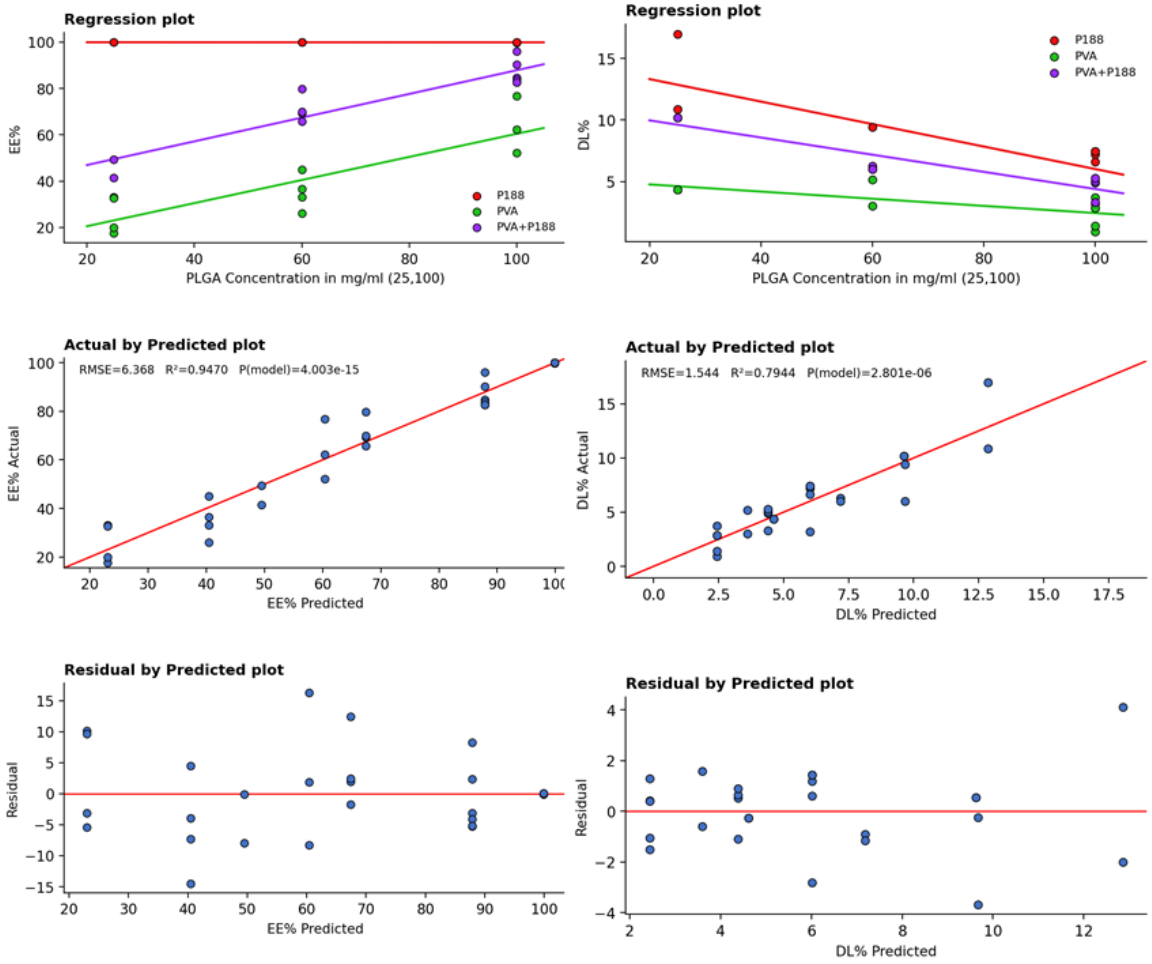

**Figure 43: Influence du type de stabilisant et de la concentration en PLGA sur l'efficacité d'encapsulation** (a) et la capacité de charge (b) des nanoparticules de PLGA. Une ANOVA à deux facteurs (type de stabilisant × concentration en PLGA) a été réalisée pour chaque réponse, suivie d'un test post-hoc de Tukey pour les comparaisons multiples entre stabilisants à chaque concentration. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001.

Afin d'évaluer simultanément l'influence du type de stabilisant et de la concentration en PLGA sur les performances de la formulation, un plan d'expérience factoriel a été mis en œuvre, faisant varier trois stabilisants (P188 à 2 %, PVA à 2 %, et PVA à 1 % + P188 à 1 %) ainsi que trois concentrations en PLGA (25, 60 et 100 mg/mL).

Contrairement à une simple comparaison de moyennes, cette approche permet non seulement d'identifier les facteurs influençant de manière significative les réponses étudiées (EE % et DL %), mais aussi d'élaborer un modèle mathématique capable d'estimer ces réponses pour des concentrations en PLGA intermédiaires n'ayant pas fait l'objet d'essais expérimentaux (par exemple, 40 ou 80 mg/mL).

Un modèle de régression linéaire a ainsi été développé, traitant la concentration en PLGA comme une variable continue et le type de stabilisant comme une variable qualitative. Il intègre également l'interaction entre les deux facteurs (concentration et stabilisant), permettant à chaque stabilisant de présenter sa propre relation concentration-réponse (Figure 44). **Les équations obtenues permettent de prédire l'efficacité d'encapsulation et le taux de charge pour chaque stabilisant au sein de la gamme étudiée.**

Les graphiques de régression (figure 44) montrent, en cohérence avec les résultats de la figure 43, que le type de stabilisant, la concentration en PLGA et leur interaction influencent de manière significative l'efficacité d'encapsulation (EE %) ($p < 0,001$). L'interaction significative indique que l'effet d'une augmentation de la concentration en PLGA dépend du stabilisant utilisé. Plus précisément, avec le PVA seul et le mélange PVA + P188, l'EE % augmente progressivement à mesure que la concentration en PLGA s'élève. **En revanche, avec le P188 seul, l'EE % reste proche de 100 % quelle que soit la concentration en PLGA**. Cette absence de variation contraste avec les deux autres stabilisants et explique l'interaction significative entre les deux facteurs.




| Réponse | Effet | Modèle de régression |
|---|---|---|
| **EE%** | Stabilisant | p < 0,001 *** |
| **EE%** | Concentration | p < 0,001 *** |
| **EE%** | Interaction | p < 0,001 *** |
| **EE%** | Qualité du modèle | $R^2$ = 0,94 |
| **DL%** | Stabilisant | p < 0,001 *** |
| **DL%** | Concentration | p < 0,001 *** |
| **DL%** | Interaction | p = 0,087 (ns) |
| **DL%** | Qualité du modèle | $R^2$ = 0,76 |

| | Equation de prédiction | | |
|---|---|---|---|
| **Réponse** | **P188** | **PVA** | **PVA+P188** |
| **EE%** | **99,9 – 0,0004×[PLGA]** | **10,5 + 0,499×[PLGA]** | **36,7 + 0,512×[PLGA]** |
| **DL%** | **15,2 – 0,091×[PLGA]** | **5,3 – 0,029×[PLGA]** | **11,4 – 0,070×[PLGA]** |

**Figure 44 : Modélisation prédictive de l'efficacité d'encapsulation EE %, et du taux de chargement en principe actif DL % en fonction de la concentration en PLGA et du type de stabilisant.** Pour chacune des réponses, un modèle de régression linéaire incluant la concentration en PLGA (variable continue, 25–100 mg/mL), le type de stabilisant (variable catégorielle) et leur interaction a été ajusté aux données expérimentales. Graphique « **Regression plot** »: droites de régression ajustées pour chaque stabilisant, superposées aux valeurs mesurées. Graphique « **Actual by Predicted plot** »: valeurs mesurées représentées en fonction des valeurs prédites par le modèle, avec la droite d'identité (y = x) ; le coefficient de détermination ($R^2$), l'erreur quadratique moyenne (RMSE) et la significativité globale du modèle (p) sont indiqués. Graphique « **Residual by Predicted plot** »: différences entre les valeurs mesurées et prédites, utilisées pour vérifier l'absence de biais systématique du modèle. Le tableau résume la significativité (test F) de chaque effet du modèle ainsi que les équations de prédiction obtenues pour chaque stabilisant. ns : non significatif (p ≥ 0,05) ; *** p < 0,001.

Concernant le taux de chargement (DL %), le type de stabilisant ($p < 0,001$) et la concentration en PLGA ($p = 0,001$) exercent également une influence significative. Toutefois, leur interaction n'est pas significative ($p = 0,087$). Cela indique qu'une augmentation de la concentration en PLGA entraîne une diminution du DL % de manière comparable pour les trois stabilisants. **En d'autres termes, l'effet de la concentration sur le DL % demeure essentiellement le même, quel que soit le stabilisant utilisé.**

Les graphiques comparant les valeurs observées aux valeurs prédites montrent une bonne concordance entre les données expérimentales et les valeurs calculées par le modèle, avec des coefficients de détermination de $R^2 = 0,94$ pour l'EE % et de $R^2 = 0,76$ pour le DL %.

Les graphiques des résidus ne révèlent aucune tendance particulière, confirmant ainsi que le modèle décrit bien les données dans le domaine expérimental étudié. Toutefois, le modèle DL% est moins précis que le modèle EE% ($R^2 = 0,76$ contre 0,947), avec une dispersion des résidus plus marquée. Les équations de prédiction pour le DL% doivent donc être interprétées ou utilisées avec plus de prudence que celles pour l'EE%.

## C.3 Formulation des TZB-NP : influence du type de stabilisant et de la concentration en PLGA sur la libération de TZB à partir des NP

Pour rappel, lors de la phase de développement préliminaire, nous avons observé un profil de libération biphasique dans le PBS avec la formulation candidate, caractérisé par une libération très rapide au cours des premières heures (*burst release*). Comme indiqué précédemment concernant la distribution de taille et l'efficacité d'encapsulation, la libération pourrait être influencée à la fois par la concentration en PLGA et par le type de stabilisant. Nous avons donc entrepris d'évaluer l'impact de ces deux facteurs sur la cinétique de libération. Après avoir démontré que le mélange PVA+P188 offrait le meilleur compromis entre l'efficacité d'encapsulation (EE %) et le taux de chargement (DL %) (Figures 43–44), nous avons évalué ses performances de libération en les comparant à celles des stabilisants utilisés seuls.

Avant de quantifier le trastuzumab libéré, la stabilité colloïdale des nanoparticules au cours de l'essai de libération a été étudiée par DLS après 24 heures, puis après 320 heures d'incubation dans du PBS à 37 °C (Figure 45). Avant d'évaluer les quantités de TZB libérées, nous avons cherché à vérifier la stabilité colloïdale des nanoparticules durant l'essai de libération. La distribution de taille des particules a donc été mesurée avant la libération, ainsi qu'après 24 et 320 heures. Il est apparu que les nanoparticules stabilisées par le P188 seul étaient tellement agrégées qu'il était impossible de déterminer leur taille au cours de l'essai de libération (Figure 45a). En revanche, pour

le PVA seul et le mélange PVA+P188, une légère tendance à l'augmentation du rayon hydrodynamique de la population majoritaire a été observée, s'accompagnant de l'apparition d'une population minoritaire supplémentaire présentant un rayon hydrodynamique compris entre 20 et 35 nm (Figure 45b). Cette population minoritaire s'est stabilisée au cours du temps pour le mélange PVA+P188, alors qu'elle a continué à augmenter légèrement pour le PVA seul jusqu'à l'échéance des 320 heures (Figure 45b).

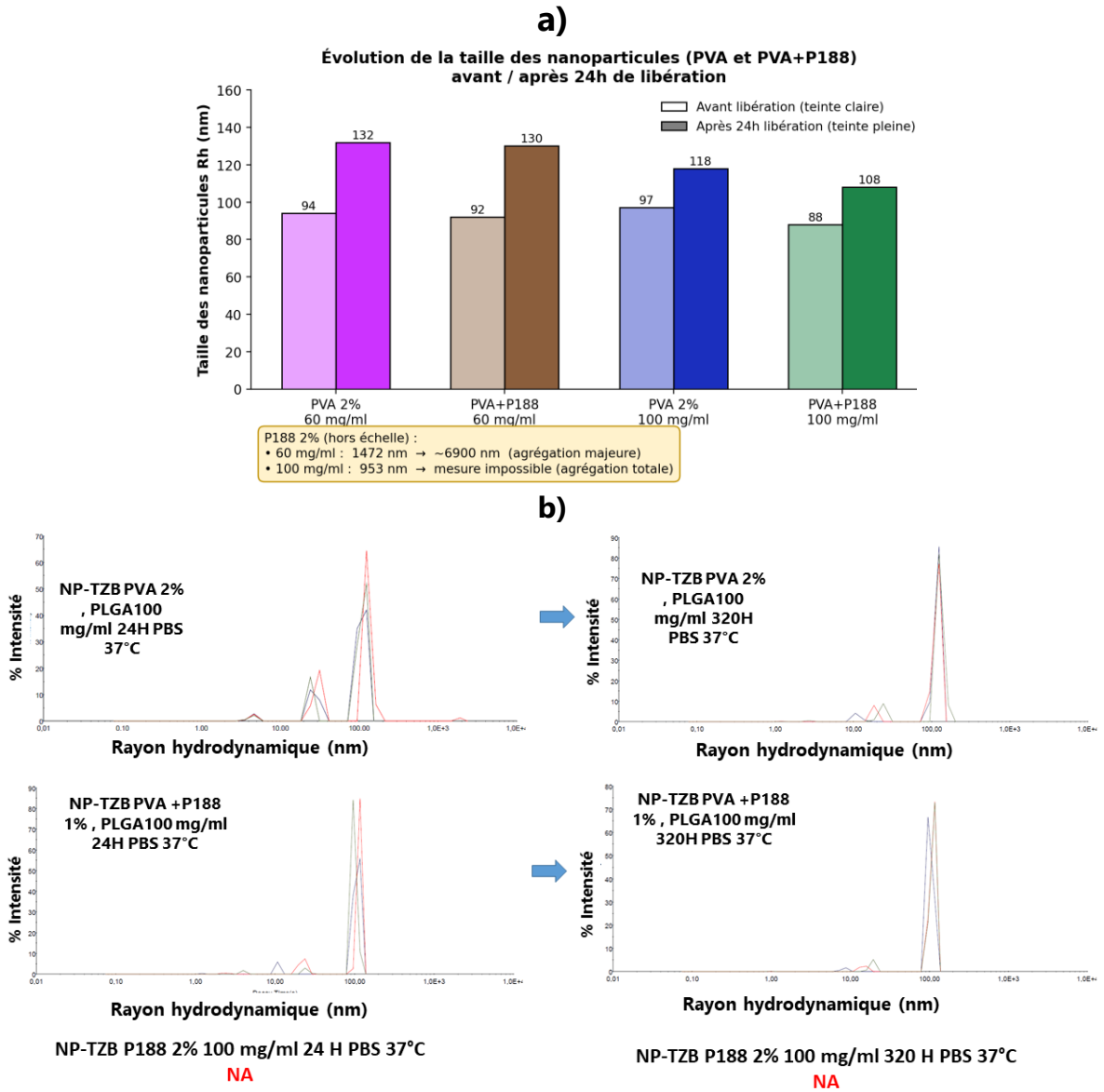



**Figure 45 : Évolution du rayon hydrodynamique (Rh) de nanoparticules avant et après un essai de libération de 24 heures et 320 heures dans du PBS à 37 °C, pour des formulations à base de PVA et de PVA+P188**. **a)** rayon hydrodynamique (Rh) de la population majoritaire mesurée par DLS avant et après 24 h de libération (teinte claire : avant ; teinte pleine : après 24 h). Les résultats concernant le stabilisant P188 seul dont la taille se situe bien au-delà de l'échelle du graphique (passant de plusieurs centaines de nanomètres, voire devenant impossible à mesurer après la libération), sont présentés séparément. **b)** Profils de distribution de taille mesurés par DLS après 24 h et 320 h de libération pour les nanoparticules chargées en TZB (PLGA 100 mg/mL), illustrant l'évolution de l'homogénéité de taille

au cours du temps pour chaque agent stabilisant. NA : mesure impossible (agrégation détectée lors de l'analyse DLS).

La cinétique de libération est présentée à la figure 46. Le P188 ayant permis d'obtenir les meilleures performances en termes d'encapsulation (EE % et DL %), bien qu'entraînant des tailles de particules plus élevées, nous avons cherché à déterminer si cette formulation permettait également une libération efficace du TZB. Comme le montre la Figure 40, toutes les formulations ont présenté une libération initiale rapide du TZB, attribuable à la fraction adsorbée à la surface des nanoparticules, ce qui concorde avec les observations antérieures. Toutefois, les formulations stabilisées uniquement par du P188, quelle que soit la concentration en PLGA ont montré une libération significativement plus lente et plus faible au cours du temps par rapport aux formulations à base de PVA (Figure 46 a, b, c). Ce comportement peut s'expliquer par la formation d'une multicouche de P188 à la surface des nanoparticules, créant une barrière supplémentaire à la diffusion du TZB associé aux interactions mécaniques associées à la centrifugation. Aussi, l'instabilité colloïdale caractérisée par l'incapacité des nanoparticules agrégées à se disperser, réduisant ainsi la surface disponible pour la diffusion du TZB peut également contribuer à cette rétention matricielle accrue, comme le montrent les résultats de distribution de taille (Figure 45).

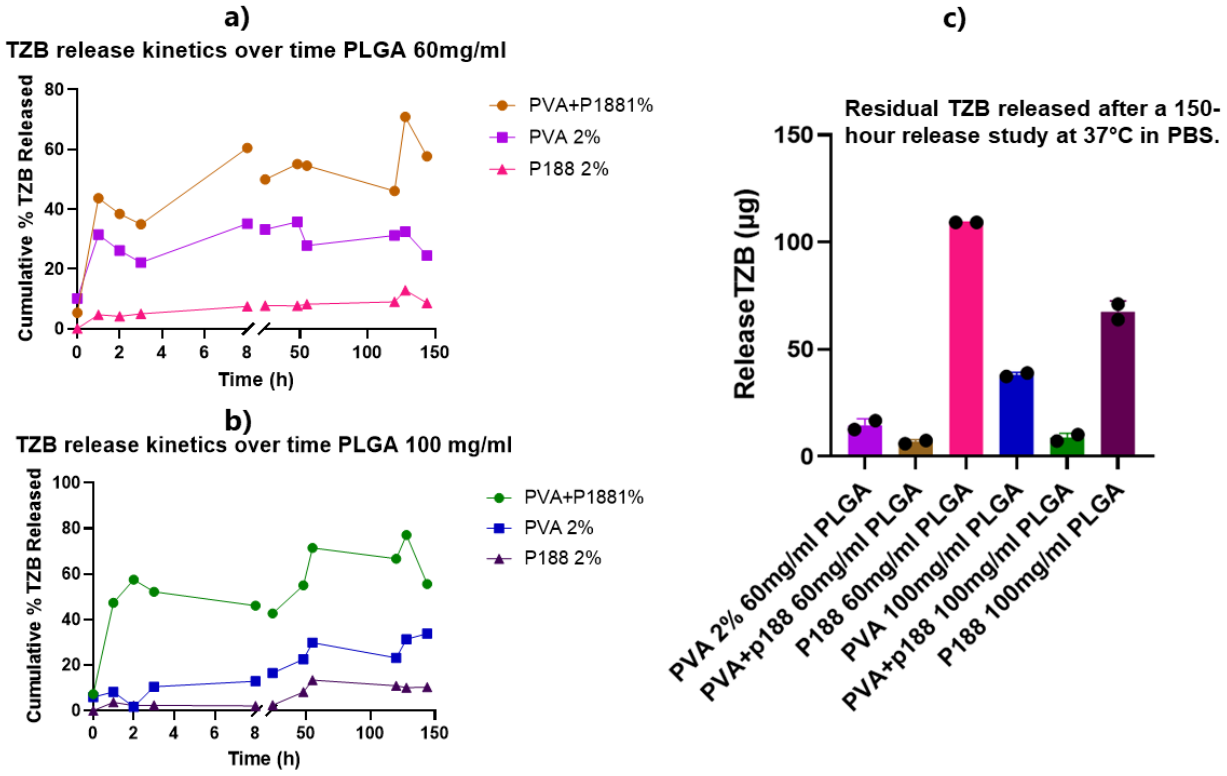
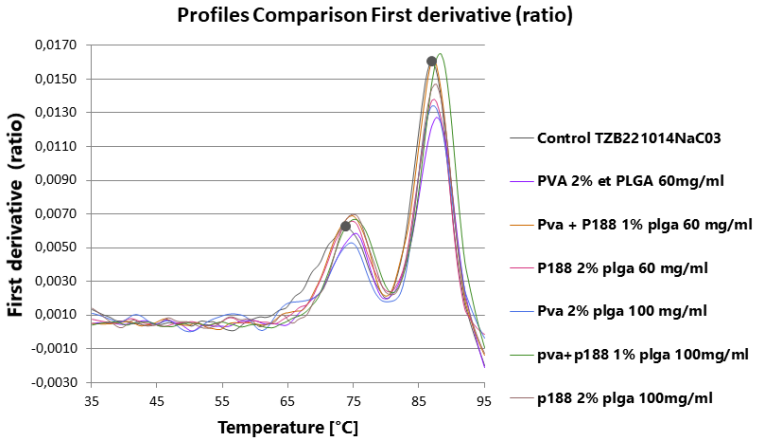



**Figure 46** : **Cinétique de libération du TZB à partir de nanoparticules de PLGA, en fonction du type de stabilisant et de la concentration en PLGA**. (a, b) Pourcentage cumulé de TZB libéré au cours du temps (jusqu'à environ 150 h) pour des nanoparticules formulées avec 60 mg/mL (a) et 100 mg/mL (b) de PLGA, en utilisant les trois stabilisants testés (PVA+P188 1 %, PVA 2 %, P188 2 %). (c) Quantité totale

(cumulée) de TZB libérée (en µg) à l'issue d'une étude de libération de 150 h dans du PBS à 37 °C, pour les six formulations (60 et 100 mg/mL de PLGA × 3 stabilisants).

Par ailleurs, la quantité totale de TZB libérée semble être influencée par la concentration en polymère : tant pour le PVA seul que pour le mélange PVA+P188, la libération est plus importante à une concentration de PLGA de 60 mg/mL qu'à 100 mg/mL (Figure 46 a, b). Ce résultat concorde avec le fait qu'à 60 mg/mL, la matrice polymère constituant la nanoparticule est proportionnellement plus réduite, facilitant ainsi la diffusion du principe actif. **Globalement, le mélange PVA+P188 conduit à une libération supérieure à celle obtenue avec le P188 ou le PVA utilisés seuls ce qui peut être probablement lié à une structure de surface mixte moins imperméable que celle obtenue avec le P188 seul, tout en conservant une efficacité d'encapsulation élevée, ce qui confirme que ce stabilisant constitue le meilleur compromis entre encapsulation et libération.**

Enfin, la stabilité structurelle du trastuzumab libéré a été évaluée par l'analyse des courbes de dénaturation thermique (Figure 47). Les températures de transition (Ti1 et Ti2) des anticorps libérés sont restées très proches de celles du trastuzumab non formulé, quelle que soit la formulation utilisée. Ces résultats indiquent que ni le type de stabilisant ni la concentration en PLGA n'ont altéré de manière significative la structure du trastuzumab au cours de la formulation et de la libération ultérieure. Une caractérisation approfondie a été réalisée ensuite sur les différentes formulations par FTIR et DSC.




| | Samples | Ti1 | Ti2 |
|---|---|---|---|
| 2 | Control TZB221014NaC03 | 73,8 | 87,0 |
| 1 | PVA 2% et PLGA 60mg/ml | 76,1 | 88,1 |
| 2 | PVA + P188 1% PLGA 60 mg/ml | 75,0 | 87,0 |
| 3 | P188 2% PLGA 60 mg/ml | 75,51 | 86,6 |
| 4 | PVA 2% PLGA 100 mg/ml | 75,0 | 86,4 |
| 5 | PVA+P188 1% PLGA 100mg/ml | 75,84 | 88,4 |
| 6 | P188 2% PLGA 100mg/ml | 75,4 | 87,8 |

**Figure 47 : Stabilité structurelle du TZB après sa libération à partir de nanoparticules de PLGA par comparaison des profils de dénaturation thermique (dérivée première du signal, Ti1/Ti2) du TZB libéré de nanoparticules après 24 h dans du PBS à 37 °C, par rapport au témoin non formulé**. Chaque pic correspond à une température de transition (dépliement) d'un domaine structural de l'anticorps ; les deux principales températures de transition identifiées (Ti1 et Ti2, en °C) sont indiquées dans le tableau pour chaque échantillon.

## C.4 Analyse par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC permet de détecter les températures de transition thermique spécifiques à chaque composant (température de transition vitreuse Tg, température de fusion Tm). L'absence, le décalage ou la disparition d'un pic caractéristique d'un composant, une fois celui-ci incorporé dans la formulation fournit des informations sur sa miscibilité ou son incompatibilité avec les autres constituants, ainsi que sur l'existence d'interactions physiques entre eux (par exemple, un décalage de la Tg ou la disparition d'un pic de fusion indique une interaction ou une modification de l'état physique du composant).

Les thermogrammes du TZB seul, des deux stabilisants et du PLGA ont d'abord été analysés séparément (figure 48); ils concordent avec les profils décrits dans la littérature. Comme la plupart des macromolécules protéiques, le TZB ne présente pas de pic de fusion. En effet, il est bien établi en accord avec notre observation que dans la plage de températures étudiée, cette protéine subit une dénaturation thermique associée à un dépliement progressif plutôt qu'à une transition de phase brutale. Le thermogramme du PLGA seul révèle une Tg de 55,8 °C, une valeur cohérente avec les données de la littérature pour un PLGA 50:50 de masse molaire comparable, dont la Tg se situe généralement entre 30 et 60 °C [298].

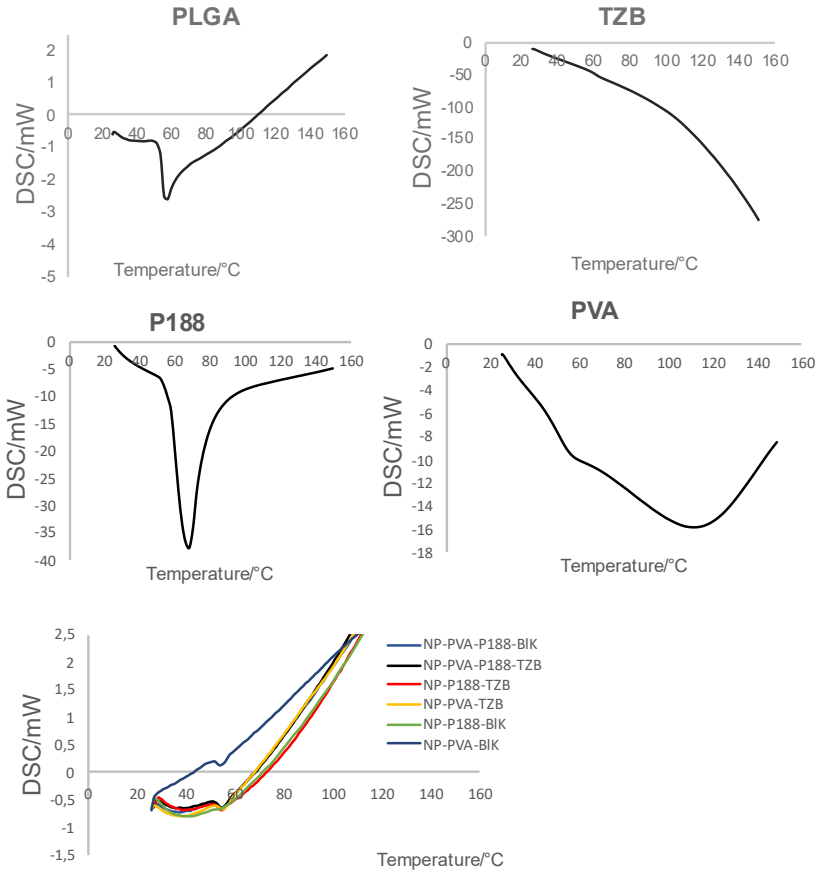



**Figure 48 : Analyse par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) des composants de la formulation et des nanoparticules de PLGA.** Les thermogrammes présentent le PLGA, le trastuzumab

(TZB), le P188 et le PVA seuls, ainsi que les nanoparticules à blanc (BLK) et celles chargées en trastuzumab (TZB) formulées avec 2 % de PVA, 2 % de P188 ou un mélange de 1 % de PVA et 1 % de P188. Les analyses ont été réalisées entre 10 et 150 °C afin d'évaluer les transitions thermiques des différents constituants ainsi que l'influence de l'encapsulation du TZB sur les propriétés thermiques de la matrice polymère.

Quel que soit le stabilisant utilisé, les thermogrammes des nanoparticules vides présentent des profils similaires, caractérisés par une transition correspondant à celle du PLGA (55,7 °C). En revanche, les transitions propres aux stabilisants seuls disparaissent une fois ceux-ci incorporés dans la formulation. Ceci indiquerait que l'étape de purification est efficace, car il a déjà été démontré que des résidus de surfactants utilisés comme stabilisants lors de la préparation des NP, notamment pour le PLGA, peuvent modifier la Tg [299,300].

*L'incorporation de TZB dans la formulation n'a pas modifié le profil thermique des nanoparticules, quelles que soient les conditions de stabilisation testées (figure 48). Cette absence de variation peut être interprétée de deux manières non exclusives. D'une part, elle pourrait indiquer la formation d'une matrice homogène dans laquelle le TZB est encapsulé sous forme amorphe, impliquant des interactions limitées entre la protéine et le polymère. D'autre part, elle pourrait également s'expliquer par une concentration de TZB effectivement encapsulé (reflétée par le taux de charge, ou DL%) trop faible pour induire une modification des propriétés thermiques du PLGA détectable par cette technique*. En effet, la présence de TZB n'a pas modifié de manière significative les propriétés thermiques du polymère. Cette observation concorde avec les résultats d'études antérieures, qui font également état d'une absence de variation de la température de transition vitreuse (Tg) pour des nanoparticules de PLGA encapsulant des protéines. Afin de déterminer si l'absence de modification du thermogramme des nanoparticules chargées en TZB résultait de l'homogénéité de la matrice ou d'une limite de sensibilité de la DSC, un mélange physique de PLGA et de TZB (non formulé) a été analysé. Ce mélange présentait une Tg identique à celle du PLGA pur (55,7 °C) et à celle des nanoparticules. Cette observation indique qu'au faible taux de charge en principe actif (DL %) utilisé, la DSC ne permet pas de détecter la présence de TZB. *Ainsi, l'absence de variation sur le thermogramme des nanoparticules reflète probablement une limite de sensibilité de la méthode plutôt qu'une preuve d'homogénéité de l'encapsulation.*

## C.5 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie FTIR permet d'identifier les groupements fonctionnels caractéristiques de chaque constituant grâce à leurs bandes de vibration spécifiques,

fournissant ainsi des informations sur leur présence et leurs interactions potentielles au sein des nanoparticules. Il est complémentaire à la DSC, en analysant la matrice de nanoparticule dans son ensemble ou le volume traversé par le faisceau. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 49.

Le PLGA présente une bande ester intense et caractéristique vers 1750–1760 $cm^{-1}$ ainsi que plusieurs bandes entre 1180 et 1080 $cm^{-1}$ correspondant aux liaisons C–O–C du polyester ; le P188 se distingue par une bande C-O-C très marquée vers 1100 $cm^{-1}$ ; le PVA montre une large bande O-H vers 3300 $cm^{-1}$ ; et le spectre de soustraction du TZB révèle les bandes amide I et II (environ 1650 et 1550 $cm^{-1}$), signatures typiques d'une protéine (figure 49).

Tous les spectres des nanoparticules sont dominés par la bande ester du PLGA, confirmant son rôle de matrice principale de la nanoparticule. Les signatures des stabilisants (bande C-O-C du P188, bandes C-O du PVA) ne sont pas très bien observées (le P188 et le PVA ont des bandes qui tombent dans une zone du spectre déjà très riche et dominée par le signal du PLGA (majoritaire en masse dans la particule)). Cette observation est en accord avec celle obtenue par DSC, qui ne montrait aucune transition spécifique aux stabilisants.

*Les spectres des nanoparticules chargées en TZB ne diffèrent pas significativement de ceux des nanoparticules vides, restant dominés par le PLGA et les stabilisants. La bande intense de l'ester du PLGA masque probablement toute contribution spécifique du TZB dans la région amide I/II (1550–1650 $cm^{-1}$), en particulier compte tenu de la faible efficacité de chargement (DL %).*

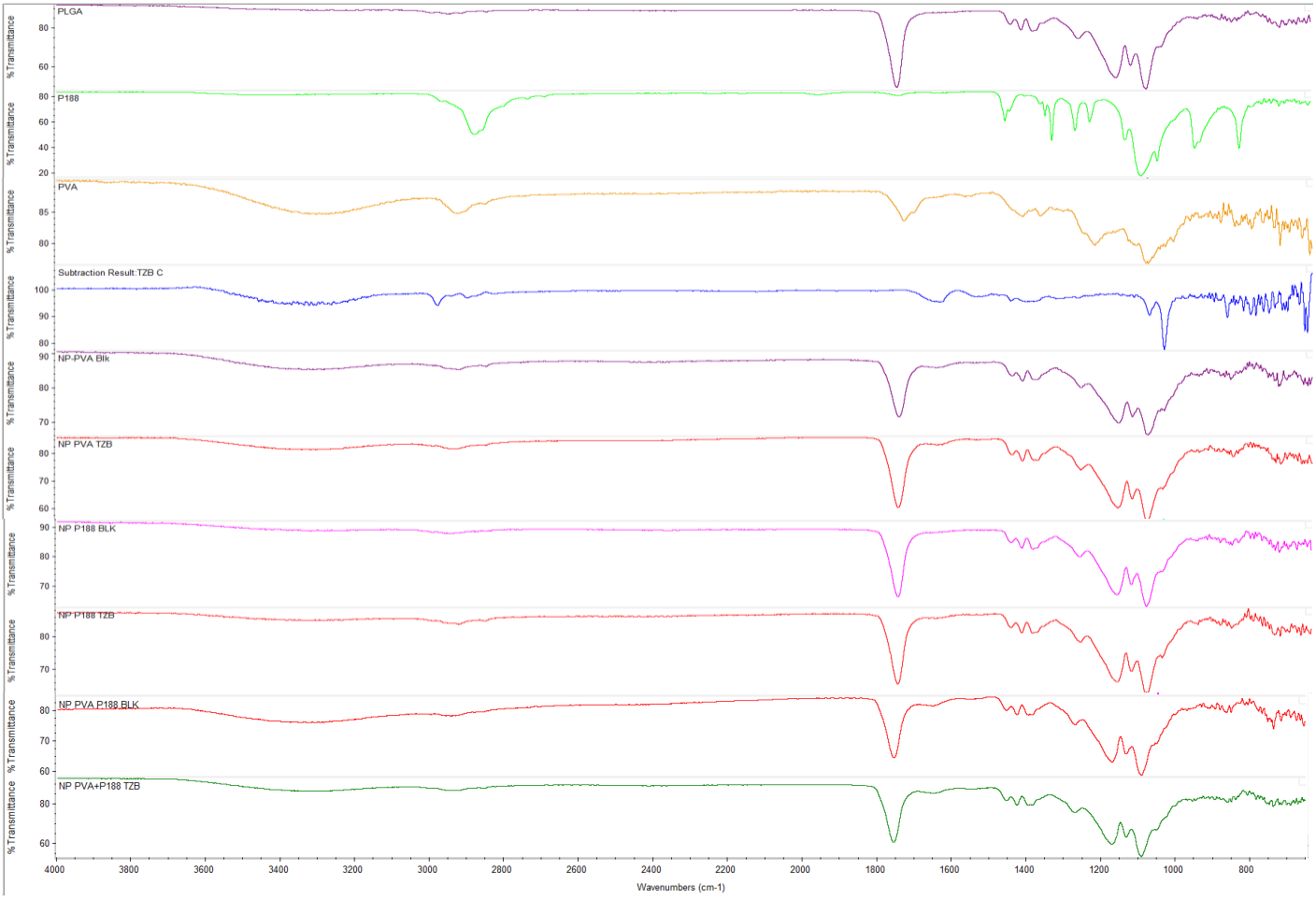



**Figure 49: Spectres FTIR des différents composants de la formulation, du TZB ainsi que des nanoparticules vides et chargées en TZB**. De haut en bas : PLGA, P188, PVA et le résultat de la soustraction spectrale du TZB (spectres des composants purs) ; nanoparticules vides et chargées en TZB stabilisées par le PVA seul, le P188 seul et le mélange PVA+P188. Les spectres des nanoparticules sont dominés par la bande caractéristique ester du PLGA (environ 1750–1760 $cm^{-1}$) ; les bandes caractéristiques des agents stabilisants (C-O-C, environ 1090–1140 $cm^{-1}$) se superposent à ce profil, confirmant leur présence à la surface des particules après purification.

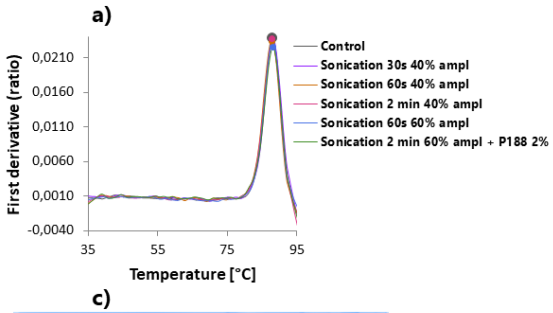
## C.6 Formulation des nanoparticules de Fab-TZB

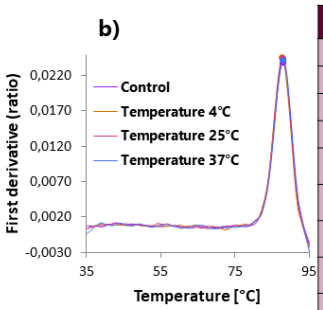
### C.6.1 Etude de stabilité du Fab-TZB dans les conditions de formulation

Le fragment Fab étant plus petit que l'anticorps entier et dépourvu des ponts disulfure inter-chaînes, il était nécessaire de vérifier que les conditions de formulation validées pour le TZB étaient également compatibles avec son Fab-TZB [301]. Comme le montre la figure 50, le Fab-TZB est demeuré stable dans toutes les conditions testées. Sa masse moléculaire est restée inchangée, sans signe de fragmentation, et une bande unique à 50 kDa a été observée par SDS-PAGE (figure 50c). Les températures d'inflexion mesurées par suivi de la fluorescence intrinsèque à l'aide du Tycho n'ont révélé aucune différence significative par rapport au témoin, indiquant que la conformation de la protéine a été préservée dans ces conditions (figures 50a et 50b). Enfin, l'analyse par

DLS a mis en évidence une distribution de taille étroite et des tailles moyennes comparables à celles du témoin, sans formation d'agrégats (figure 50d).

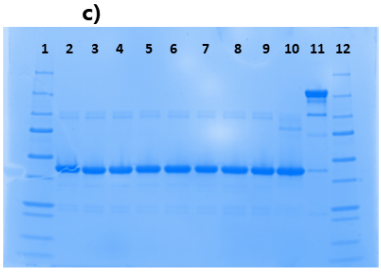
Compte tenu de cette bonne stabilité, les mêmes conditions de formulation que celles utilisées pour le TZB intact ont été retenues pour le Fab-TZB. La sonication a été réalisée sur glace et le P188 (2,5 %) a été conservé dans la phase aqueuse interne afin de réduire les risques de dénaturation et d'agrégation liés aux contraintes mécaniques et aux interfaces générées lors de la sonication. Par conséquent, la formulation de Fab-TZB a pu être préparée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le trastuzumab intact.




| | Capillary label | Ti |
|---|---|---|
| 1 | Control | 87,9 |
| 2 | Temperature 4°C | 87,7 |
| 3 | Temperature 25°C | 87,9 |
| 4 | Temperature 37°C | 87,9 |
| 5 | Sonication 30s 40% ampl | 88,0 |
| 6 | Sonication 60s 40% ampl | 87,7 |
| 7 | Sonication 2 min 40% ampl | 87,8 |
| 8 | Sonication 60s 60% ampl | 87,9 |
| 9 | Sonication 2 min 60% ampl + P188 2% | 88,0 |

c)




1 : MP
2 : control
3 : 1H Température 4°C
4 :1H Température 25°C
5: 1H Température 37°C
6 : Sonication 30 s 40% ampl
7 : Sonication 60 s 40% ampl
8 : Sonication 2 min 40% ampl
9 : Sonication 60 s 60% ampl
10 : Sonication 2 min 60% ampl+P188
11 : TZB
12 : MP

d)

| Stabilité de Fab-TZB (DLS) | | | |
|---|---|---|---|
| | Conditions | Rayon h nm | PDI (%) |
| Température (1h) | 4°C | 2,81 ± 0,04 | 8,83 ± 0,90 |
| | 25°C | 2,67 ± 0,13 | 7,53 ± 1,14 |
| | 37°C | 2,76 ± 0,13 | 7,03 ± 2,76 |
| Sonication 40% ampl. | 30 s | 2,81 ± 0,19 | 9,60 ± 0,35 |
| | 60 s | 2,76 ± 0,08 | 5,83 ± 5,05 |
| Sonication 60% ampl. | 2 min | 2,65 ± 0,16 | 7,73 ± 1,76 |
| | 60 s | 2,76 ± 0,01 | 7,60 ± 0,35 |
| | 2 min (+P188) | 2,33 ± 0,04 | 9,27 ± 0,65 |
| Référence | Contrôle | 2,96 ± 0,16 | 8,93 ± 1,00 |

**Figure 50: Évaluation de la stabilité du fragment Fab-TZB dans les conditions retenues pour le procédé de formulation.** (a, b) Profils de dénaturation thermique du Fab-TZB, obtenus par analyse de la dérivée première de la fluorescence intrinsèque en fonction de la température, après diverses conditions de sonication ou après 1 h d'incubation à 4, 25 ou 37 °C (b). Les températures d'inflexion (Ti) mesurées pour chaque condition sont indiquées dans les tableaux. (c) Analyse SDS-PAGE du Fab-TZB soumis aux mêmes conditions de stress, comparé à un marqueur de masse moléculaire (MW) et au trastuzumab intact (TZB). (d) Rayon hydrodynamique et indice de polydispersité (PDI) du Fab-TZB mesurés par DLS après les différents traitements (moyenne ± écart-type, n = 3).

### C.6.2 Formulation et caractérisation de nanoparticules de PLGA chargées en Fab-TZB

Au cours du développement des nanoparticules chargées en TZB, certaines conditions ont été reproduites en parallèle pour le Fab-TZB afin de comparer les deux formats protéiques en termes de taille et d'efficacité d'encapsulation. Ces résultats sont présentés dans la Figure 51.

Globalement, le procédé de formulation standard (stabilisant PVA 2%) a permis d'obtenir des caractéristiques satisfaisantes concernant le rayon hydrodynamique (76

à 96 nm, selon les conditions), avec une distribution de taille étroite (PDI inférieur à 10 % dans tous les cas ; Figure 51a). Ces tailles sont restées conformes au critère de qualité établi (rayon hydrodynamique < 100 nm) et sont restées stables, quelle que soit la concentration en PLGA (60 ou 100 mg/mL) ou le format de la protéine encapsulée (TZB entier ou fragment Fab) (Figure 51a–d). Les profils de distribution obtenus par DLS (Figure 51b, c) confirment cette homogénéité de distribution de taille, montrant un pic unique et étroit tant pour le Fab-TZB que pour le TZB entier à une concentration en PLGA de 100 mg/mL. La comparaison statistique des rayons hydrodynamiques (Figure 51d) montre que les différences entre les matrices vides et chargées sont significatives dans certains cas selon les conditions, alors que la comparaison entre le TZB et son Fab-TZB à des concentrations de PLGA équivalentes ne révèle aucune différence significative ; cela suggère que le format de la protéine encapsulée n'influence pas de manière marquée la taille finale des nanoparticules.

Concernant l'efficacité d'encapsulation (EE %, Figure 51e), l'augmentation de la concentration en PLGA améliore l'encapsulation pour les deux formats protéiques, comme attendu et comme observé précédemment avec d'autres formulations dans cette étude (Figures 43–44). Par ailleurs, le Fab-TZB présente une tendance à une efficacité d'encapsulation légèrement supérieure à celle du TZB entier à des concentrations de PLGA équivalentes (100 mg/mL : ~70 % contre ~65 % ; 60 mg/mL : ~63 % contre ~58 %). Toutefois, ces résultats reposent sur un nombre limité de réplicats et doivent être interprétés avec prudence ; une confirmation à l'aide de lots supplémentaires serait nécessaire avant de tirer une conclusion définitive quant à l'effet du format de la protéine sur l'encapsulation.

D'autres études de formulation secondaires ont été menées dans le cadre de ce projet, elles ont eu pour objectif d’explorer diverses concentrations de PLGA, proportions de stabilisant et compositions de mélanges P188/PVA afin d'améliorer ces propriétés. Ces résultats ne sont pas présentés dans ce travail.

a)

| Code | PLGA (mg/mL) | Formulation | Rayon hydrodynamique (nm) | PDI (%) |
|---|---|---|---|---|
| 250527NTLK01 | 100 | Blanche (PBS) | 86 ± 6 | 7,88 ± 2,05 |
| 250527NTLK02 | 100 | TZB (1 mg) | 96 ± 4 | 7,14 ± 1,78 |
| 250527NTLK03 | 100 | Fab-TZB (1 mg) | 84 ± 4 | 8,8 ± 1,8 |
| 250527NTLK04 | 60 | Blanche | 76 ± 2 | 7,10 ± 2,53 |
| 250527NTLK05 | 60 | TZB (1 mg) | 79 ± 4 | 8,30 ± 1,05 |
| 250527NTLK06 | 60 | Fab-TZB (1 mg) | 82 ± 8 | 7,6 ± 1,9 |

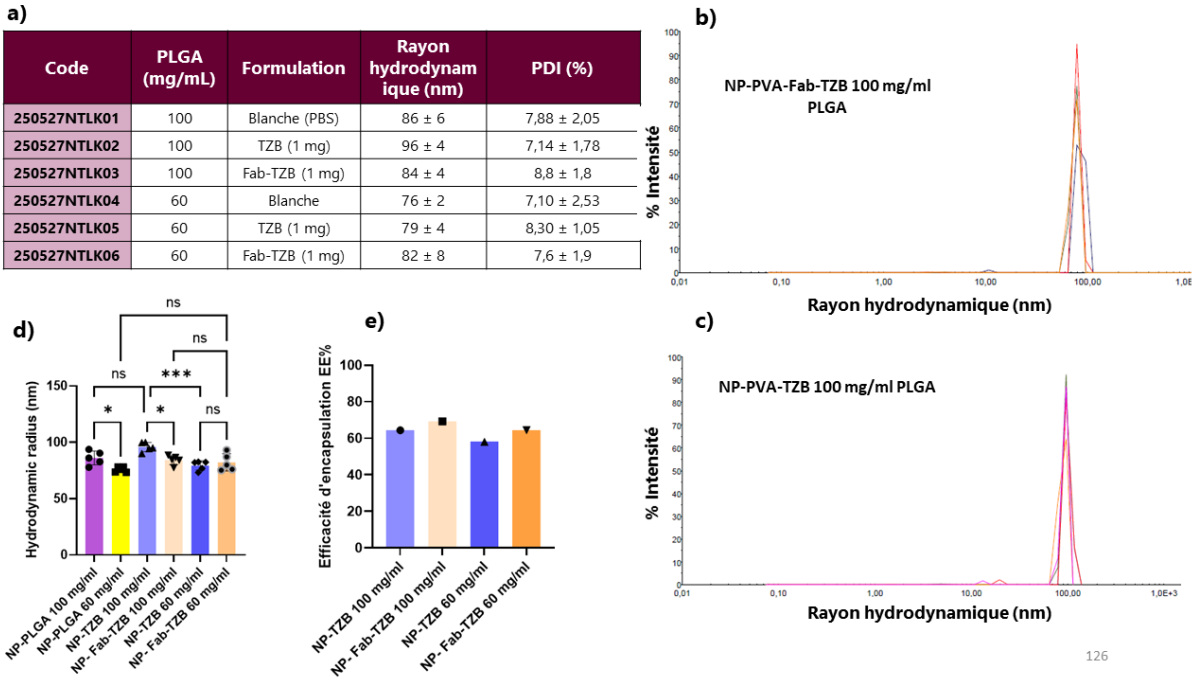



**Figure 51: Caractérisation des nanoparticules de PLGA stabilisées au PVA 2 % et chargées en trastuzumab entier (TZB) ou en fragment Fab-TZB.** (a) Tableau récapitulatif du rayon hydrodynamique et de l'indice de polydispersité (PDI) des différentes formulations (nanoparticules vides, chargées en TZB ou en Fab-TZB, préparées avec 60 ou 100 mg/mL de PLGA ; moyenne ± écart-type). (b, c) Profils de distribution de taille par DLS des nanoparticules chargées en Fab-TZB (b) et en TZB entier (c), préparées avec 100 mg/mL de PLGA. (d) Comparaison du rayon hydrodynamique des différentes formulations (nanoparticules vides, chargées en TZB ou en Fab-TZB, préparées avec 60 ou 100 mg/mL de PLGA). Les comparaisons statistiques sont indiquées (ns : non significatif ; * $p < 0,05$ ; *** $p < 0,001$). (e) Efficacité d'encapsulation (EE %) du TZB entier et du Fab-TZB pour les formulations préparées avec 60 et 100 mg/mL de PLGA.

Afin de développer davantage cette stratégie, une étude galénique plus approfondie du Fab-TZB a été initiée dans le cadre d'un stage de master 2 que j'ai encadré. Sur la base des résultats précédemment obtenus pour le TZB entier, deux paramètres critiques ont été sélectionnés pour cette optimisation : la concentration de PLGA (50, 75 et 100 mg/mL) et la composition du stabilisant, combinant PVA et P188 selon quatre proportions (0,375 %/0,125 % ; 0,9 %/0,1 % ; 1,35 %/0,15 % ; 1,5 %/0,5 % m/v). Ces compositions ont été choisies sur la base d'observations préliminaires en laboratoire, en tenant compte du risque d'agrégation à fortes concentrations de P188 déjà identifié pour le TZB entier. La combinaison de ces trois concentrations de PLGA et de ces quatre compositions de stabilisant a permis de générer un plan d'expériences de 12 formulations (tableau 11).

Les résultats montrent que la majorité des formulations présentaient un rayon hydrodynamique inférieur à 100 nm, avec une distribution granulométrique étroite (Tableau 11). Une seule formulation a conduit à des nanoparticules plus grandes (130 nm). Cette formulation combinait la concentration de PLGA la plus élevée (100 mg/mL) avec la concentration totale de stabilisant la plus faible (0,5 % ; PVA/P188 : 0,375/0,125 %). Cette observation pourrait refléter un déséquilibre entre la quantité de polymère et la concentration de stabilisant, conduisant à une stabilisation moins efficace des gouttelettes de double émulsion et, par conséquent, à la formation de nanoparticules plus grosses.

L'analyse de l'efficacité d'encapsulation a révélé une influence combinée de la concentration en PLGA et de la composition du mélange de stabilisants. La formulation associant la plus faible concentration en PLGA (50 mg/mL) à la plus faible concentration totale de stabilisants (0,5 %, PVA/P188 : 0,375/0,125 %) a présenté la capacité de chargement la plus élevée (DL50 = 8,77 %), une valeur significativement supérieure à celle obtenue avec le trastuzumab entier. Ce résultat confirme l'hypothèse selon laquelle le faible poids moléculaire du fragment Fab permet d'incorporer une plus grande quantité de protéine pour une quantité donnée de polymère. Par ailleurs, comme observé précédemment avec le trastuzumab entier, l'augmentation de la concentration en PLGA s'est accompagnée d'une diminution de la capacité de chargement.

L'augmentation de la concentration totale de stabilisant, et plus précisément de la proportion de Poloxamer 188, s'est accompagnée d'une diminution significative de l'efficacité d'encapsulation. Les formulations 10 à 12, contenant le mélange PVA/P188 le plus concentré (1,5/0,5 %), ont ainsi présenté les valeurs d'EE% les plus faibles du plan d'expérience (16,5 à 36,8 %). Ces résultats suggèrent que la composition du mélange PVA/P188 influence davantage l'efficacité d'encapsulation que la concentration totale de stabilisant. L'équilibre entre les deux tensioactifs apparaît donc comme un facteur déterminant pour obtenir simultanément une bonne efficacité d'encapsulation, une capacité de chargement élevée et des nanoparticules de taille appropriée.

**Tableau 11 : composition et caractérisation physico-chimique de formulations de nanoparticules de PLGA chargées en Fab-TZB, selon un plan expérimental combinant trois concentrations de PLGA (50, 75, 100 mg/mL) et quatre compositions de stabilisant PVA/P188.**

| Code | Concentration de PLGA (mg/mL) | Concentrations de PVA/P188 (% m/v) | Concentration totale de stabilisants (% m/v) | Rh (nm) | EE (%) | DL (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 50 | 0,375/0,125 | 0,5 | 77 | 71,52 | 8,77 |
| 2 | 75 | 0,375/0,125 | 0,5 | 84 | 60,12 | 3,95 |
| 3 | 100 | 0,375/0,125 | 0,5 | 130 | 75,53 | 4,28 |
| 4 | 50 | 0,9/0,1 | 1 | 75 | 52,67 | 6,22 |
| 5 | 75 | 0,9/0,1 | 1 | 104 | 80,47 | 3,38 |
| 6 | 100 | 0,9/0,1 | 1 | 88 | 72,07 | 4,89 |
| 7 | 50 | 1,35/0,15 | 1,5 | 77 | 59,3 | 6,27 |
| 8 | 75 | 1,35/0,15 | 1,5 | 93 | 63,51 | 7,01 |
| 9 | 100 | 1,35/0,15 | 1,5 | 93 | 45,44 | 4,03 |
| 10 | 50 | 1,5/0,5 | 2 | 75 | 16,51 | 2,58 |
| 11 | 75 | 1,5/0,5 | 2 | 72 | 33,32 | 1,11 |
| 12 | 100 | 1,5/0,5 | 2 | 78 | 36,78 | 5,33 |

La caractérisation physico-chimique de la formulation sélectionnée confirme également un décalage du potentiel zêta, de −6,77 mV pour les nanoparticules vides à +1,65 mV pour les nanoparticules chargées de Fab-TZB, et une morphologie sphérique homogène confirmée par microscopie électronique à transmission (Figure 52).

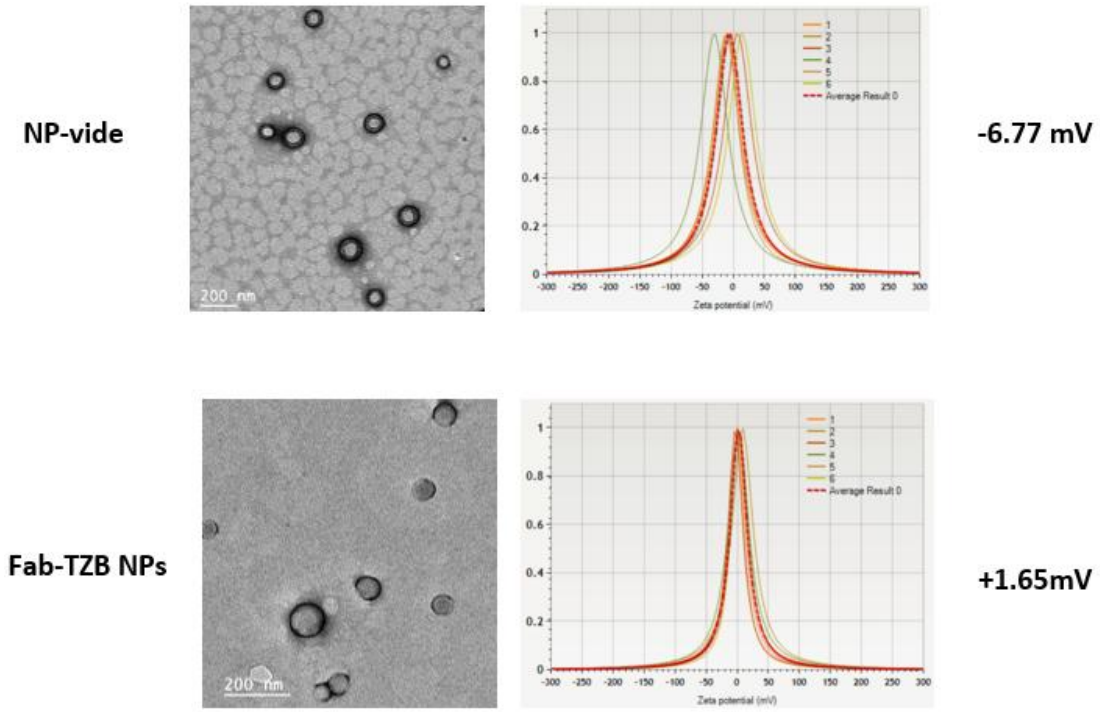



**Figure 52 : Caractérisation de la formulation retenue de nanoparticules de PLGA chargées en Fab-TZB (PLGA 50 mg/mL ; PVA/P188 0,375 %/0,125 %).** Images de microscopie électronique à transmission (MET) des nanoparticules vide et chargées en Fab-TZB, montrant une morphologie sphérique et une surface lisse (échelle : 200 nm). Distribution du potentiel zêta des deux formulations, mettant en évidence un décalage de la charge de surface de −6,77 mV (nanoparticules vierges) à +1,65 mV (nanoparticules Fab-TZB).

Des caractérisations complémentaires ont été réalisées sur la formulation sélectionnée afin d'évaluer les propriétés du Fab-TZB après encapsulation et libération (Figure 53). Les analyses par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), fluorescence intrinsèque et cytométrie en flux ont montré que le procédé de formulation n'altérait ni l'intégrité structurale du fragment Fab ni sa capacité de liaison au récepteur HER2. Le Fab-TZB libéré conservait une forte affinité pour HER2, avec une constante de dissociation (Kd) de l'ordre du nanomolaire et une capacité de liaison maximale comparable à celle du Fab-TZB natif.

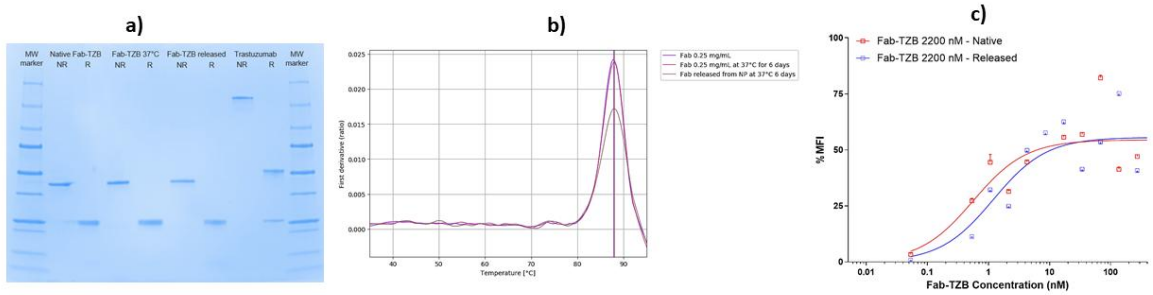



**Figure 53: Caractérisation structurale et fonctionnelle du fragment Fab-TZB après formulation et libération à partir de nanoparticules de PLGA.** (a) Analyse SDS-PAGE du Fab-TZB natif et du Fab-TZB libéré des nanoparticules en conditions non réductrices (NR) et réductrices (R), montrant des profils de migration comparables. (b) Profils de dénaturation thermique obtenus par fluorescence intrinsèque (Tycho®), comparant le Fab-TZB natif et le Fab-TZB libéré après incubation à 37 °C pendant 6 jours, sans variation significative de la température de transition. (c) Courbes de liaison du Fab-TZB natif et libéré au récepteur HER2 sur les cellules BT474, déterminées par cytométrie en flux, montrant la préservation de l'affinité de liaison dans la gamme nanomolaire après formulation et libération.

Cependant, l'étude de la cinétique de libération met en évidence un phénomène de libération initiale plus marqué que celui observé avec le trastuzumab entier, avec environ 82 % du Fab-TZB libéré dans les premiers instants. Le contrôle de cette libération initiale constitue donc un axe d'amélioration commun aux formulations de trastuzumab entier et de fragments Fab.

Bien que ces résultats soient basés sur un nombre limité d'expériences et nécessitent d'être confirmés, ils soulignent le potentiel du fragment Fab-TZB pour améliorer la capacité de chargement des nanoparticules. Cependant, ils montrent également que le *burst release* reste un défi, quel que soit le format d'anticorps utilisé.

# D. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le développement de la formulation présenté dans la première partie des résultats de cette étude et la littérature, a permis d'identifier, les paramètres clés influençant les propriétés des nanoparticules de PLGA chargées en TZB. Cette phase initiale a abouti à la sélection d'une formulation candidate répondant aux spécifications en matière de taille et d'efficacité d'encapsulation. La formulation a par la suite démontré sa pertinence sur un modèle *in vitro* de barrière épithéliale nasale utilisant des cellules RPMI 2650. *L'encapsulation du TZB au sein des nanoparticules a entraîné une augmentation dépendante de la concentration de la perméabilité d'environ neuf fois par rapport au trastuzumab libre. Cette amélioration a été attribuée à la capacité des nanoparticules de PLGA à faciliter le transport transépithélial via des mécanismes transcellulaires non spécifiques, tels que la diffusion rapide dans le mucus suivi de la transcytose liés aux propriétés intrinsèques des nanoparticules de PLGA*. Ces observations sont cohérentes avec les données de la littérature qui ont rapporté pour divers anticorps encapsulés dans des nanoparticules polymériques une amélioration de la biodistribution dans le cerveau.

Cependant, bien que ce modèle constitue un outil utile pour comparer différentes formulations tout en limitant ainsi le recours aux essais sur les animaux, il ne reproduit que de manière partielle la complexité de la muqueuse nasale. Il ne prend notamment pas en compte les terminaisons nerveuses olfactives, décrites comme une voie de transport majeure vers le cerveau. Par conséquent, les performances observées *in vitro* ne permettent pas de prédire directement le comportement des formulations après une administration *in vivo*.

Le passage aux études *in vivo* a soulevé une contrainte majeure liée au volume limité pouvant être administré par voie intranasale. Avec la formulation candidate retenue, la charge en TZB était relativement faible (taux compris entre 1,14 % et 1,8 %). Pour atteindre une dose thérapeutique équivalente à celle utilisée en pratique clinique, il aurait fallu administrer des volumes importants de suspension ou des suspensions présentant des concentrations très élevées en nanoparticules. Or, une concentration élevée en nanoparticules accroît la viscosité de la formulation, ce qui peut entraver sa pulvérisation et sa diffusion dans la cavité nasale, compromettant ainsi son efficacité. Par conséquent, l'augmentation de la charge en TZB (DL%) s'est rapidement imposée comme une étape indispensable pour poursuivre le développement préclinique, puis clinique.

De plus, l'objectif était également d'améliorer le profil de libération du trastuzumab en limitant le phénomène de *burst release* observer avec la formulation initiale. Deux

approches complémentaires ont été envisagées. La première consistait à augmenter la charge en TZB entier par une optimisation de la formulation. La seconde reposait sur l'utilisation du fragment Fab. Au-delà des avantages pharmacocinétiques évoqués en introduction, notamment l'absence de domaine Fc susceptible d'interagir avec le récepteur FcRn, le fragment Fab peut présenter également des atouts du point de vue galénique. Son poids moléculaire, représentant environ un tiers de celui du trastuzumab entier, pourrai offrir la possibilité d'une meilleure encapsulation au sein de la matrice polymère.

Afin d'améliorer la formulation du TZB entier, plusieurs paramètres ont été définis sur la base de résultats antérieurs : le type de PLGA (50:50 RG504H), la concentration en TZB (fixée à 6,8 mg/ml) et les rapports de volume des différentes phases. Les paramètres retenus pour l'optimisation étaient le type de stabilisant et la concentration en PLGA, deux facteurs susceptibles d'influencer simultanément la taille des nanoparticules, l'efficacité d'encapsulation et la capacité de charge. Les systèmes stabilisants explorés étaient le P188, le PVA, et leur mélange, pour une concentration finale en stabilisant fixée à 2%.

Le plan d'expérience a confirmé que ces deux paramètres influencent de manière significative les réponses étudiées. La concentration en PLGA détermine principalement la quantité de matrice disponible pour encapsuler l'anticorps. L'augmentation de cette concentration améliore ainsi l'efficacité d'encapsulation mais réduit mécaniquement la capacité de charge, cette dernière étant exprimée par rapport à la masse totale des nanoparticules, constituée majoritairement de PLGA. Cette tendance concorde avec les observations rapportées dans diverses études sur les nanoparticules polymériques.

Comme l'ont montré des études préliminaires, le PVA est le stabilisant permettant d'obtenir les nanoparticules les plus uniformes. À l'exception des formulations préparées avec 25 mg/mL de PLGA, les tailles obtenues étaient conformes aux spécifications établies. Ce constat concorde avec l'influence de la concentration en polymère sur la viscosité de la phase organique. Une viscosité plus élevée favorise la formation de gouttelettes plus stables lors de l'émulsification, ce qui conduit à des nanoparticules plus uniformes.

En revanche, l'utilisation du P188 seul a entraîné une forte agrégation des nanoparticules après purification, malgré ses performances en termes d'efficacité d'encapsulation et de taux de charge. Ce comportement avait déjà été observé lors d'études portant sur des nanoparticules à vide. L'hypothèse selon laquelle la présence de trastuzumab ou une concentration plus élevée en PLGA pourrait atténuer cette agrégation ne s'est finalement pas vérifiée.

Ces observations concordent avec les données de la littérature. Il a été démontré qu'à des concentrations élevées, le P188 peut former plusieurs couches adsorbées à la

surface des nanoparticules de PLGA selon un mécanisme décrit par l'isotherme de Freundlich, entraînant une augmentation de la taille des particules et une hétérogénéité de la surface [302]. La concentration utilisée dans cette étude (2 %, soit 20 g/L) est bien supérieure au seuil décrit pour cette transition d'une monocouche vers une multicouche. Des résultats similaires ont également été rapportés pour des nanoparticules de PLGA chargées en méthotrexate [303]. Par ailleurs, nos observations suggèrent que l'étape de purification accentue cette instabilité, probablement en favorisant les contacts interparticulaires lors des cycles successifs de centrifugation, ce qui expliquerait la formation d'agrégats observée par microscopie électronique.

Malgré cette limitation, le P188 présente plusieurs avantages. Son segment hydrophobe PPO s'adsorbe à la surface du PLGA, tandis que les chaînes PEO restent orientées vers la phase aqueuse. Cette disposition limite probablement la diffusion du trastuzumab vers la phase externe lors de la seconde étape d'émulsification, ce qui pourrait expliquer les valeurs d'efficacité d'encapsulation élevées obtenues. Une interaction entre le TZB et cette couche de P188 pourrait également favoriser sa rétention au sein des nanoparticules.

*La combinaison de 1 % de PVA et de 1 % de P188 semble constituer le meilleur compromis. Elle préserve les propriétés colloïdales favorables conférées par le PVA tout en bénéficiant de l'amélioration du taux de chargement apportée par le P188. Les nanoparticules obtenues présentent des tailles adaptées à une administration nasale, des valeurs d'EE % proches de 90 % et des taux de chargement en TZB (DL) nettement supérieurs à ceux obtenus avec le PVA seul.*

Les analyses DSC et FTIR n'ont révélé aucune modification majeure des propriétés thermiques ou chimiques de la matrice polymère. Cette absence de différence est probablement due à la faible proportion de trastuzumab encapsulé par rapport à la masse de PLGA, cette dernière dominant les signaux obtenus via ces deux techniques.

Au-delà de son intérêt galénique, la présence de P188 pourrait également conférer un avantage biologique. Plusieurs études suggèrent que les nanoparticules enrobées de P188 adsorbent préférentiellement l'apolipoprotéine E et interagissent ensuite avec les récepteurs LDL, facilitant ainsi le transport vers le cerveau [304]. D'autres études indiquent également que le P188 pourrait limiter l'efflux médié par la glycoprotéine P, améliorant potentiellement la biodistribution cérébrale [305]. Ces propriétés pourraient, en partie compenser les limitations liées à la taille observées lorsque le P188 est utilisé à des concentrations élevées.

Une étude de la cinétique de libération du TZB à partir de nanoparticules stabilisées par ces différents systèmes stabilisants ainsi que de l'influence des concentrations en PLGA (60 et 100 mg/mL) a révélé que, quel que soit le stabilisant ou la concentration, un phénomène similaire de *burst release* se produisait au cours des premières heures.

Ce comportement est largement décrit pour les nanoparticules de PLGA encapsulant des protéines et est généralement attribué à la libération de la fraction de principe actif adsorbée ou située à proximité de la surface de la particule, tandis que la seconde phase correspond à la diffusion progressive du médicament à travers sa matrice polymérique [306,307].

Dans notre étude, cette libération initiale ne semble pas résulter d'un défaut de purification. En effet, les trois étapes de lavage à l'eau ont produit des surnageants dans lesquels les taux de TZB étaient inférieurs à la limite de quantification, indiquant que l'anticorps libre avait été efficacement éliminé. *Nous avons donc émis l'hypothèse que cette libération brutale provenait principalement d'une fraction de TZB faiblement liée au sein des couches superficielles de la matrice de PLGA, plutôt que d'anticorps simplement présents dans la suspension.*

Pour vérifier cette hypothèse, un lot de production de la formulation stabilisée par le mélange PVA+P188 a été lavé avec du PBS (une solution à forte teneur en sels) au lieu de l'eau. Cette modification du procédé de lavage n'a pas altéré de manière significative la taille des nanoparticules (Figure 54a), mais a entraîné une diminution marquée du taux de chargement en TZB (DL %) par rapport aux formulations lavées à l'eau (Figure 54b). La force ionique du milieu de lavage semble donc avoir un impact significatif sur la dissociation de la fraction de TZB faiblement liée à la matrice polymère, un mécanisme cohérent avec une désorption électrostatique favorisée par les sels présents dans le PBS. Le trastuzumab présente un point isoélectrique compris entre 8,5 et 9, ce qui signifie qu'à pH physiologique (PBS, pH 7,4), il porte une charge nette positive. L'augmentation de la force ionique du milieu réduit la portée des interactions électrostatiques (écrantage des charges selon la théorie de Debye-Hückel), ce qui peut favoriser le détachement des molécules les plus faiblement liées à la surface ou situées dans les couches périphériques des nanoparticules. Ce mécanisme a déjà été décrit pour plusieurs protéines encapsulées dans des nanoparticules polymères [203,298,308].

Cependant, les mesures de potentiel zêta n'ont révélé aucune modification significative suite à l'encapsulation du trastuzumab (Figure 54c). Dans tous les cas, les nanoparticules présentaient un potentiel proche de la neutralité, quelle que soit la formulation. Cette absence de variation suggère que la quantité de trastuzumab exposée à la surface des nanoparticules reste faible ou est partiellement masquée par la couche stabilisante. En particulier, les chaînes hydrophiles de PVA et de P188 pourraient former une couche d'hydratation limitant la contribution du trastuzumab au potentiel de surface. Des observations similaires ont été rapportées pour des nanoparticules de PLGA encapsulant des protéines, où le potentiel zêta reste principalement déterminé par la composition de surface du polymère plutôt que par le principe actif encapsulé [307].

Au-delà de cette phase initiale, les profils de libération variaient selon le système de stabilisation. Les formulations contenant le mélange PVA + P188 ont présenté la libération cumulée la plus élevée, avec une faible quantité de TZB résiduel dans la matrice après 320 heures. À l'inverse, les nanoparticules stabilisées uniquement par le P188, bien qu'ayant affiché les meilleurs taux d'efficacité d'encapsulation et de taux de chargement, ont retenu une quantité importante de trastuzumab au sein de la matrice à l'issue de l'étude de libération. Ces résultats suggèrent que la bonne capacité d'encapsulation du P188 s'accompagne d'une rétention plus forte de l'anticorps, probablement liée à la structure de surface spécifique induite par ce stabilisant, laquelle pourrait agir comme une barrière supplémentaire à la diffusion du principe actif.

L'amélioration de ce profil de libération est importante dans le contexte de l'administration intranasale. En effet, le mucus nasal est continuellement renouvelé par le biais de l'épuration mucociliaire, avec un temps de renouvellement généralement estimé entre 15 et 20 minutes chez l'homme [309,310]. *L'objectif n'est donc pas d'éliminer totalement le burst release, mais plutôt de la limiter, afin de permettre aux nanoparticules de traverser la muqueuse nasale avant qu'une proportion significative de trastuzumab ne soit libérée dans la cavité nasale. Toutefois, une fois les nanoparticules acheminées vers le tissu cérébral, une libération progressive du trastuzumab devient souhaitable pour maintenir sa disponibilité vis-à-vis des cellules tumorales exprimant HER2*.

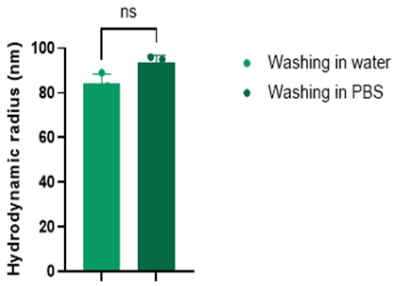
Dans cette optique, nous avons étudié l'utilisation d'un enrobage au chitosane pour créer une barrière supplémentaire susceptible de limiter la diffusion prématurée du TZB. Le chitosane présente plusieurs propriétés avantageuses pour l'administration intranasale. Il est mucoadhésif, favorise l'ouverture transitoire des jonctions serrées et peut prolonger le temps de résidence des formulations sur la muqueuse nasale [311,312].

Deux stratégies d'enrobage ont été évaluées. La première consistait à introduire le chitosane dissous dans de l'acide acétique à 0,1 %, directement lors de l'étape d'évaporation du solvant. Cette approche a entraîné une augmentation significative de la taille des nanoparticules ainsi qu'une agrégation importante après purification, conduisant à la formation d'un culot difficile à remettre en suspension. Une seconde stratégie, impliquant le dépôt de chitosane après la formulation des nanoparticules, a donné le même résultat. Ces observations peuvent être attribuées à la forte interaction électrostatique entre le chitosane protoné et la surface des nanoparticules, favorisant la formation de ponts interparticulaires lors des étapes successives de centrifugation.

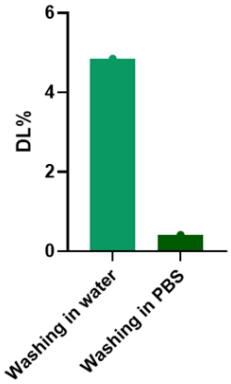
Malheureusement, l'indisponibilité de chitosane hydrosoluble, en particulier le triméthylchitosane, dont les propriétés sont mieux adaptées aux formulations à pH physiologique, a empêché l'exploration d'alternatives plus prometteuses. Néanmoins,

cette approche demeure une piste d'optimisation intéressante pour les développements futurs.

a)




b)




c)

| Formulation | État | Potentiel zêta moyen (mV) |
|---|---|---|
| **PVA 2%** | Blanc | +1,63 |
| **PVA 2%** | Chargé TZB | +0,06 |
| **P188 2%** | Blanc | **NA** |
| **P188 2%** | Chargé TZB | NA |
| **PVA+P188** | Blanc | −6,77 |
| **PVA+P188** | Chargé TZB | +0,73 |

**Figure 54: Effet du milieu de lavage sur la taille, la charge en principe actif et le potentiel zêta des nanoparticules de PVA+P188 chargées en TZB**. (a) Rayon hydrodynamique des nanoparticules lavées à l'eau ou au PBS (moyenne ± écart-type ; ns : différence non significative). (b) Capacité de charge (DL %) des nanoparticules selon le milieu de lavage utilisé (eau ou PBS). (c) Potentiel zêta moyen des nanoparticules à vide et chargées en TZB pour les formulations PVA 2 %, P188 2 % et PVA+P188 (NA : données non disponibles pour les nanoparticules à vide contenant uniquement du P188).

*En résumé, cette étude a révélé que le mélange PVA/P188 offrait le meilleur équilibre entre stabilité colloïdale, taille des nanoparticules, efficacité d'encapsulation, capacité de charge et profil de libération. Toutefois, les essais d'enrobage au chitosane n'ont pas permis d'améliorer davantage les performances de la formulation, soulignant la nécessité d'explorer d'autres dérivés du chitosane ou des approches alternatives de fonctionnalisation de surface. Enfin, les performances prometteuses du fragment Fab-TZB nécessitent d'être confirmées par l'étude d'une gamme plus large de formulations et par des analyses biologiques complémentaires, afin d'évaluer son potentiel en tant qu'alternative au trastuzumab entier pour une administration intranasale*.

# E. DONNEES SUPPLEMENTAIRES

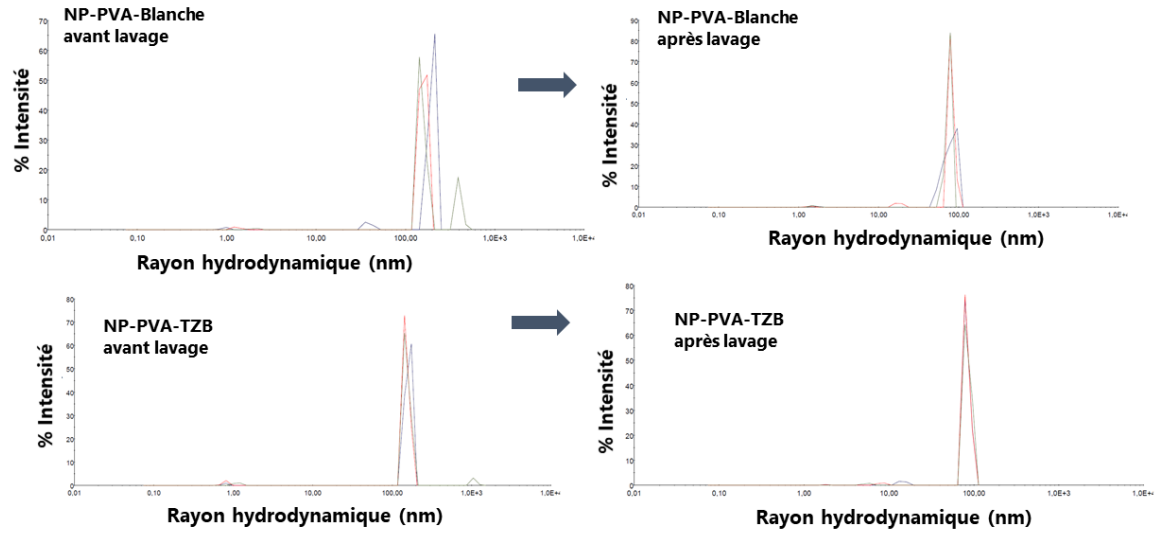



**Figure supplémentaire 4: Profils de distribution de taille par DLS de nanoparticules de PLGA 504H stabilisées par du PVA à 2 %, avant et après purification, en présence et en l'absence de trastuzumab**. Nanoparticules vides (NP-PVA-Blanche) et nanoparticules chargées en trastuzumab (NP-PVA-TZB).

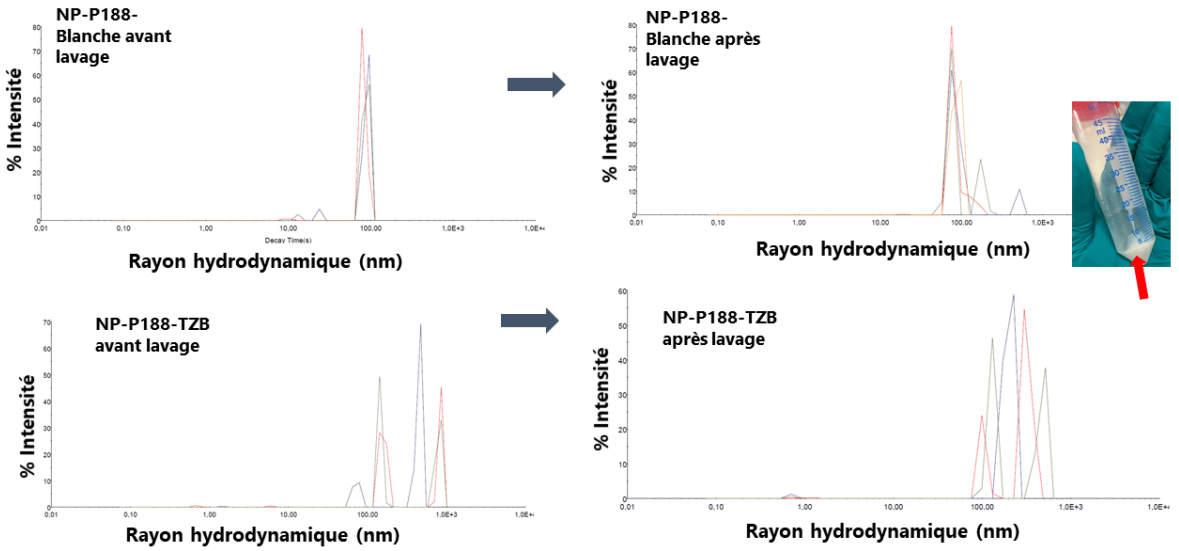



**Figure supplémentaire 5: Profils de distribution de taille obtenus par DLS pour des nanoparticules de PLGA 504H stabilisées par du P188 à 2 %, avant et après purification, en présence et en l'absence de trastuzumab**. Les nanoparticules vides (NP-P188-Blanche) et les nanoparticules chargées en trastuzumab (NP-P188-TZB), avant et après purification. La photo tube montre l'aspect du culot après centrifugation, révélant la formation d'un précipité compact difficile à remettre en suspension de manière homogène.

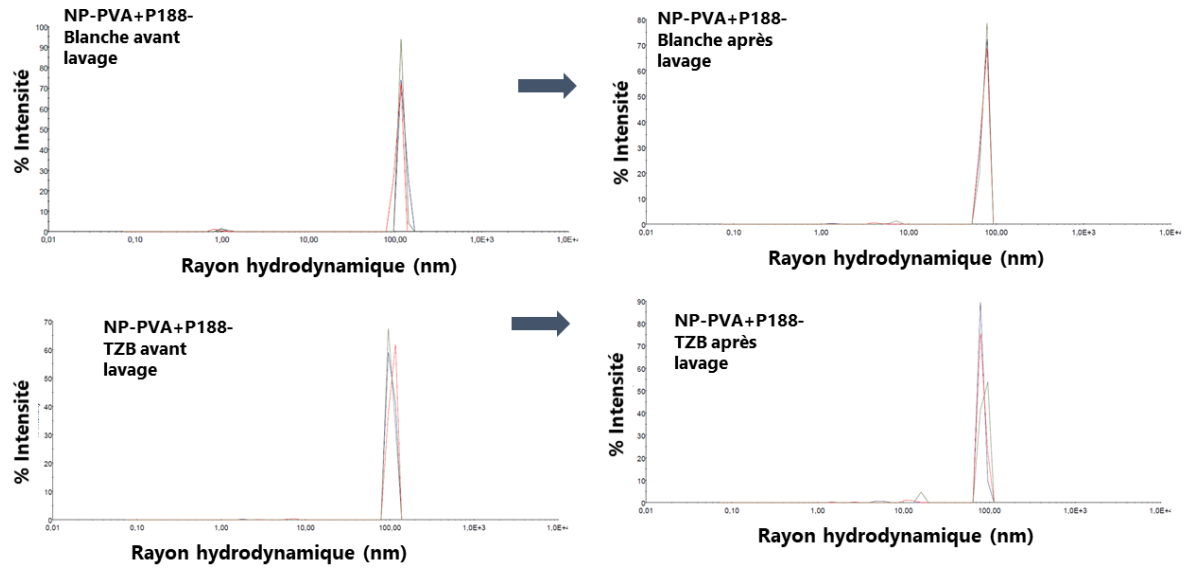



**Figure supplémentaire 6: Profils de distribution de taille (par DLS) de nanoparticules de PLGA 504H stabilisées par un mélange PVA à 1 % + P188 à 1 %, avant et après purification, en présence et en l'absence de trastuzumab.** Nanoparticules vides (NP-PVA+P188-Blank) et nanoparticules chargées en trastuzumab (NP-PVA+P188-TZB), avant et après trois cycles de lavage. Le resserrement de la distribution et la réduction de la taille après purification confirment l'efficacité du procédé de lavage pour les formulations contenant le mélange PVA+P188.

# IV. ÉVALUATION PRECLINIQUE *IN VIVO* DE LA FORMULATION

## A. INTRODUCTION DE L'ETUDE

Les résultats obtenus sur des modèles *in vitro* ont montré que l'encapsulation du trastuzumab dans des nanoparticules de PLGA améliore significativement son passage à travers un modèle d'épithélium nasal tout en préservant sa fonctionnalité. Il nous a semblé par la suite essentiel d'évaluer la pertinence de cette approche sur un modèle plus complet. Cette phase du projet répond au troisième objectif de la thèse : évaluer, sur un modèle animal, la pertinence de la formulation développée pour l'administration d'un anticorps thérapeutique par voie N2B.

Bien que les modèles *in vitro* restent pertinents pour évaluer la perméabilité de l'épithélium nasal et permettent de limiter le nombre d'animaux utilisés en amont, ils ne peuvent se substituer entièrement aux études *in vivo*. L'épithélium nasal murin présente une plus grande complexité, notamment du fait de la présence de neurones olfactifs intégrés, absents du modèle RPMI2650. Une revue préliminaire de la littérature a permis d'élaborer des protocoles respectant les principes éthiques applicables, en particulier des volumes d'administration compatibles avec la cavité nasale de la souris.

Cette étude poursuit également un second objectif : comparer les voies d'administration conventionnelle (IV) et intranasale, ainsi que le TZB libre et formulé, afin d'évaluer objectivement la contribution de l'approche N2B dans ces conditions. Deux approches complémentaires ont été mises en œuvre à cette fin.

**Choix du modèle animal**

Une revue de la littérature a été menée afin de sélectionner le modèle animal le plus approprié pour cette étude. Les souris BALB/c immunocompétentes et les souris Nude immunodéficientes ont été envisagées. Les souris Nude sont particulièrement adaptées aux études de biodistribution après administrations répétées, car elles développent une faible réponse immunitaire contre le trastuzumab. Cependant, pour cette étude de validation de principe, basée sur une administration unique et un prélèvement précoce (4 h et 24 h), les souris BALB/c ont été choisies. Ce modèle permet d'étudier la biodistribution initiale du trastuzumab dans des conditions physiologiques, tout en limitant le risque d'interférence lié au développement d'anticorps anti-médicament.

**Mise en place du protocole expérimental**.

Sur la base de données de la littérature sur l'administration intranasale chez la souris, les contraintes anatomiques de la cavité nasale et les doses de trastuzumab utilisées un protocole expérimental a été établie. Une attention particulière a été portée au volume administré afin de limiter le passage de la formulation dans les voies respiratoires ou digestives. Le volume total a ainsi été fixé à 10 µL par animal, administré progressivement par fractions de 2,5 µL, en alternant les deux narines. Nous avons initié une première étude de biodistribution chez des souris BALB/c après une administration intranasale unique. Les animaux ont été répartis en trois groupes : un groupe recevant des nanoparticules vides (NP-Blanc), un groupe recevant du trastuzumab libre (Free-TZB) et un groupe recevant des nanoparticules chargées en trastuzumab (NP-TZB) (figure 55). Le trastuzumab libre et les nanoparticules de TZB ont été administrés à une dose équivalente de 4 mg/kg dans du PBS. Le groupe recevant des nanoparticules vides été considéré comme contrôle.

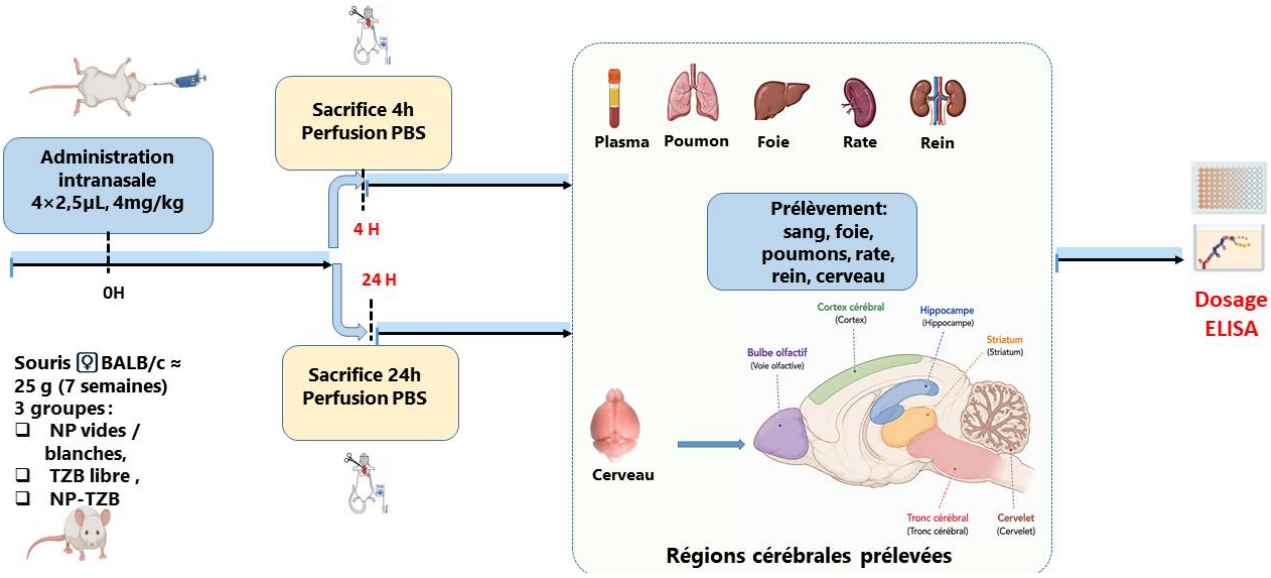



**Figure 55 : Protocole expérimental utilisé pour l'étude de biodistribution *in vivo***. Trois groupes de souris BALB/c (NP vides, TZB libre et NP-TZB) ont reçu une administration intranasale (4 × 2,5 µL ; 4 mg/kg). Les animaux ont été perfusés avec du PBS puis sacrifiés 4 h ou 24 h après l'administration. Le plasma, les organes périphériques et plusieurs régions cérébrales ont été prélevés pour l'analyse quantitative du trastuzumab par ELISA.

Deux temps de prélèvement, 4 heures et 24 heures après l'administration, ont été retenus pour évaluer la distribution précoce du trastuzumab et son évolution au cours du temps. Avant le prélèvement des organes, les animaux ont subi une perfusion intracardiaque de PBS pendant environ 10 minutes. Cette étape visait à éliminer le sang résiduel des tissus et à limiter la surestimation de la concentration de trastuzumab due à sa présence dans le compartiment vasculaire.

Le plasma, les poumons, le foie, la rate, les reins et le cerveau ont ensuite été prélevés. Afin d'obtenir une analyse plus précise de la biodistribution cérébrale, le cerveau a été

disséqué en plusieurs régions : bulbes olfactifs, cortex, hippocampe, striatum, substance blanche, tronc cérébral et cervelet. Les échantillons ont été conditionnés et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse ELISA. Cette approche avait pour but de permettre la comparaison de la distribution du trastuzumab libre et formulé, d'évaluer la contribution des nanoparticules de PLGA et d'identifier une éventuelle distribution préférentielle dans les régions cérébrales associées aux voies olfactives et trigéminales.

**Développement d'une approche d'imagerie moléculaire**

Parallèlement à l'étude de biodistribution par analyses quantitatives réalisées par ELISA, une seconde approche est en cours de développement pour permettre le suivi non invasif de la biodistribution du trastuzumab *in vivo*. Cette stratégie repose sur le radiomarquage de l'anticorps, suivi de son évaluation par imagerie, afin de visualiser sa distribution dans l'organisme et son évolution au cours du temps. Contrairement aux analyses réalisées après prélèvement d'organes par ELISA, l'imagerie moléculaire permet de suivre la biodistribution chez le même animal au fil du temps, tout en réduisant le nombre d'animaux nécessaires aux études précliniques. Ce projet a été initié dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire, l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) et la plateforme d'imagerie IMATHERA (Centre Georges-François Leclerc, Dijon). En plus de l'étude de la biodistribution du trastuzumab, libre ou encapsulé dans des nanoparticules de PLGA, cette collaboration a pour objectif de développer une approche d'imagerie diagnostique associée à l'immunothérapie. Cette stratégie pourrait permettre de suivre la distribution des anticorps et la progression des métastases cérébrales. Deux stratégies de radiomarquage sont actuellement évaluées afin d'identifier l'approche la plus appropriée pour la formulation développée dans cette thèse.

L'un des principaux défis de ce développement consiste à déterminer le moment optimal du radiomarquage lors du processus de formulation, tout en préservant l'intégrité des anticorps et en minimisant l'exposition des opérateurs aux éléments radioactifs. Deux stratégies sont actuellement en cours d'évaluation : le radiomarquage après la formulation de nanoparticules encapsulant le trastuzumab préalablement conjugué à un agent chélateur, et le radiomarquage du trastuzumab conjugué avant son encapsulation dans les nanoparticules. La comparaison de ces deux approches permettra d'identifier la stratégie la plus adaptée aux futures études de biodistribution par imagerie.

# DISCUSSION GENERALE

La prise en charge des métastases cérébrales issues d'un cancer du sein HER2-positif repose sur des thérapies ciblées administrées par voie systémique, fondées sur des associations de petites molécules ciblées, de trastuzumab et/ou de conjugués anticorps-cytotoxiques (ADC) dérivés du TZB. Bien que certaines données cliniques indiquent une amélioration de la survie, cette approche thérapeutique reste un défi majeur. En effet, le TZB ne traverse que très peu la BHE intacte : les concentrations dans le LCR ne représentent qu'environ 0,1 % à 0,3 % des concentrations plasmatiques après une administration intraveineuse hebdomadaire [56], avec un ratio sérum/LCR pouvant atteindre 420:1 avant la radiothérapie [313]. L'obtention de doses thérapeutiques par voie intraveineuse (IV) nécessite donc l'administration de doses systémiques élevées. Cette observation est étayée par l'incidence accrue de métastases cérébrales chez les patients traités par TZB par voie IV, malgré un contrôle efficace des lésions extracérébrales [314].

Au-delà du phénomène de résistance, la présence de barrières cérébrales constitue donc un obstacle majeur. L'efficacité de certaines molécules en particulier les anticorps et leurs dérivés actuellement disponibles semble liée à la perméabilité de la barrière hémato-tumorale (BHT), plus perméable que la BHE. Toutefois, l'hétérogénéité de cette perméabilité au sein d'une même tumeur, d'un patient à l'autre et selon le stade de développement rend impossible la maîtrise ou la prédiction de la réponse thérapeutique [114]. L'administration intrathécale de TZB est une alternative ayant déjà fait l'objet d'évaluations en clinique. Elle s'est révélée efficace dans le traitement de la carcinomatose leptoméningée HER2+, probablement lié à une localisation anatomique favorable à la perméabilité par flux de convection après injection intrathécale [315]. Cependant, lorsque la tumeur n'est pas située à proximité du site d'injection, cette stratégie s'est avérée inefficace, notamment parce qu'une concentration accrue dans le LCR ne garantit pas la biodisponibilité au sein du parenchyme cérébral. Par ailleurs, il a été démontré que le TZB injecté est efficacement éliminé du LCR vers la circulation sanguine via le récepteur FcRn, avec une demi-vie apparente dans le LCR d'environ 4,1 ± 3,0 heures seulement [316].

La voie nasale, grâce aux terminaisons nerveuses olfactives et trigéminales présentes dans la cavité nasale, s'est présentée comme une alternative non invasive potentielle pour contourner la BHE et permettre la biodistribution de macromolécules vers le cerveau. Plusieurs études précliniques ont démontré qu'elle favorise le transport d'anticorps thérapeutiques jusqu'au cerveau [317–319]. Cependant, la perméabilité reste généralement faible pour les anticorps administrés sous forme libre, et les signaux observés *in vivo* sont souvent modestes [319]. Cette limitation est probablement liée à

plusieurs contraintes intrinsèques à cette voie : la présence d'enzymes protéolytiques, la clairance mucociliaire et le volume limité de la cavité nasale. Ces contraintes sont particulièrement marquées pour les anticorps entiers, car leur nature macromoléculaire et hydrophile restreint leur passage à travers l'épithélium nasal par des mécanismes paracellulaires, et leur nature protéique les rend sensibles à la dégradation par les protéases présentes dans la cavité nasale.

Dans ce contexte, il est devenu nécessaire de développer une formulation adaptée pour améliorer la biodistribution cérébrale. Contrairement à la voie IV, où les anticorps sont principalement formulés pour assurer leur stabilité, la voie nasale requiert un système capable à la fois de protéger l'anticorps et de faciliter son passage à travers la muqueuse nasale. Parmi les diverses stratégies envisageables, les nanoparticules polymères et lipidiques s'imposent comme des vecteurs particulièrement prometteurs, grâce à leur capacité à protéger les biomolécules, à en contrôler la libération et à améliorer leur délivrance. Les anticorps sont largement utilisés en nanomédecine comme ligands de ciblage pour les vecteurs de troisième génération. Ils sont alors fixés à la surface de liposomes ou de nanoparticules lipidiques afin d'orienter ces systèmes vers des cellules ou des tissus spécifiques. Notre objectif était toutefois différent consistant à utiliser les nanoparticules non pas comme support d'un anticorps de ciblage, mais comme véhicule pour le TZB lui-même, afin de protéger cette macromolécule lors de l'administration nasale et d'améliorer sa biodistribution cérébrale.

Parmi les stratégies de vectorisation envisageables, nous avons sélectionné des nanoparticules polymériques à base de PLGA. C'est un polymère synthétique, biocompatible, biodégradable et approuvé par la FDA et l'EMA. Il est largement utilisé pour concevoir des systèmes à libération contrôlée et il a déjà démontré sa capacité à améliorer la biodistribution cérébrale de plusieurs petites molécules administrées par voie intranasale, aussi bien dans des modèles *in vitro* qu'*in vivo* [307,320]. Le PLGA présente également des avantages pratiques, car il pourrait permettre d'obtenir des formulations lyophilisables, améliorant ainsi leur stabilité et leur conservation à long terme.
Cependant, peu d'études se sont intéressées sur l'encapsulation d'anticorps monoclonaux dans des nanoparticules de PLGA pour une administration intranasale. La formulation de grosses biomolécules, telles que le trastuzumab, présente un défi supplémentaire en raison de leur sensibilité aux contraintes mécaniques et aux interfaces générées lors du procédé de formulation, ainsi que de leur faible efficacité d'encapsulation. L'un des objectifs de cette thèse était donc d'évaluer la faisabilité de cette approche et d'identifier les paramètres clés pour obtenir une formulation compatible avec une administration de la voie nasale vers le cerveau.

Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules constituent un facteur déterminant de leur efficacité. Parmi celles-ci, la taille et la charge de surface jouent un rôle majeur dans leur interaction avec la muqueuse nasale. Une taille inférieure à 200 nm est généralement considérée comme favorable à la diffusion à travers le réseau de mucus nasal et permet de minimiser leur piégeage [321,322]. La charge de surface influence également leur comportement. Les nanoparticules cationiques, souvent obtenues par fonctionnalisation au chitosane, sont reconnues pour leurs propriétés muco-adhésives, qui prolongent leur temps de résidences dans la cavité nasale. À l'inverse, les nanoparticules neutres ou faiblement chargées diffusent plus rapidement dans le mucus en raison d'interactions électrostatiques limitées avec les mucines [321,323]. Ainsi, la charge de surface semble davantage moduler le mécanisme et la vitesse de transport que la capacité intrinsèque des nanoparticules à atteindre le cerveau.

Dans ce contexte, nous avons mis au point des nanoparticules de PLGA présentant un rayon hydrodynamique inférieur à 100 nm, une charge quasi neutre et une efficacité d'encapsulation moyenne de 57 %. Cette formulation a augmenté d'environ neuf fois le passage du trastuzumab à travers un modèle d'épithélium nasal *in vitro*, tout en préservant son intégrité structurelle et sa fonctionnalité. Ces résultats démontrent la faisabilité d'associer les propriétés protectrices d'un nanovecteur polymériques à une stratégie N2B pour améliorer le passage d'un anticorps thérapeutique. Toutefois, nous avons identifié le problème d'une faible charge en TZB (DL% de 1,14 à 1,8 %), ce qui nécessiterait l'administration d'un volume important de suspension de nanoparticules pour atteindre la dose requise, alors que le volume administrable par voie intranasale est limité à environ 100-200 µL par narine chez l'humain et inférieur à 20 µL chez la souris [310,322,324]. L'augmentation de l'efficacité de la charge en TZB s'est donc rapidement imposée comme une étape cruciale pour la poursuite du développement de cette stratégie.

Face à cette limitation, nous avons cherché à augmenter le taux de chargement en principe actif en optimisant deux paramètres clés de la formulation : le type de stabilisant et la concentration en PLGA. Notre plan d'expériences a confirmé que ces deux facteurs influençaient de manière significative le DL et l'EE. Parmi les stabilisants évalués, le P188 a suscité un intérêt particulier. Outre l'amélioration de l'encapsulation du trastuzumab, il a été rapporté que ce composé favorise l'adsorption de l'apolipoprotéine E à la surface des nanoparticules ; cela pourrait faciliter l'interaction avec les récepteurs des lipoprotéines exprimés par les cellules endothéliales cérébrales, améliorant ainsi la biodistribution vers le cerveau [304]. Toutefois, utilisé seul, le P188 entraînait une agrégation importante des nanoparticules, rendant leur redispersibilité difficile après purification. L'association du P188 et du PVA (à raison de 1 % pour chaque stabilisant) a permis de pallier ce problème tout en maintenant une bonne

efficacité d'encapsulation et un taux de chargement moyen d'environ 5,3 %, une valeur nettement supérieure à celle obtenue avec le PVA seul. Cette formulation constitue ainsi le compromis optimal entre taille, stabilité colloïdale et capacité de chargement.

L'étude de la cinétique de libération a néanmoins mis en évidence un phénomène de *burst release* observé pour toutes les formulations. Ce phénomène est largement observé et décrit dans la littérature pour les protéines encapsulées dans des nanoparticules de PLGA et est généralement attribué à la libération rapide de la fraction protéique située à la surface des particules ou à proximité de la surface [306,307]. Dans notre étude, cette hypothèse est étayée par des essais de lavage au PBS, au cours desquels la force ionique a entraîné une diminution significative de l'efficacité d'encapsulation sans altérer les caractéristiques physiques des nanoparticules, suggérant la présence d'une fraction de trastuzumab faiblement associée à la matrice polymère. En revanche, les analyses par DSC et FTIR n'ont pas permis de mettre en évidence des interactions spécifiques entre le trastuzumab et le PLGA, probablement en raison de la faible efficacité d'encapsulation obtenue, ce qui limite la sensibilité de ces techniques.

Ce profil de libération n'est pas nécessairement défavorable dans le contexte d'une administration par voie nasale vers le cerveau. L'objectif n'est pas d'empêcher totalement la libération initiale, mais de la ralentir suffisamment pour permettre aux nanoparticules de traverser l'épithélium nasal avant de libérer le trastuzumab. Une fois dans le tissu cérébral, une libération progressive permettrait alors au trastuzumab d'interagir avec les récepteurs HER2 exprimés par les cellules tumorales. Cet objectif revêt une importance particulière dans la mesure où la clairance mucociliaire renouvelle le mucus nasal en une quinzaine de minutes environ, limitant ainsi le temps disponible pour le transport des nanoparticules à travers la muqueuse [309,310].

L'un des principaux axes d'amélioration identifiés au cours de ce travail concerne la maîtrise du profil de libération du trastuzumab. Une stratégie privilégiée consisterait à fonctionnaliser la surface des nanoparticules avec un polymère biocompatible, tel que le chitosane, afin de créer une barrière de diffusion limitant la libération initiale du médicament. Au-delà du contrôle de la cinétique de libération, le chitosane présente plusieurs propriétés particulièrement avantageuses pour l'administration de médicaments N2B. Sa nature cationique favorise la muco-adhésion, prolonge le temps de résidence des nanoparticules dans la cavité nasale et peut accroître transitoirement la perméabilité épithéliale en modulant les jonctions serrées.

Les premières expériences menées dans le cadre de cette thèse n'ont pas permis d'obtenir des nanoparticules suffisamment stables, principalement en raison des conditions acides nécessaires à la solubilisation du chitosane, lesquelles favorisaient l'agrégation. Les travaux ultérieurs pourraient donc explorer des dérivés hydrosolubles,

tels que le triméthylchitosane ou le carboxyméthylchitosane, déjà utilisés pour l'administration intranasale de biomolécules et permettant d'éviter ces conditions de formulation.

Au-delà de l'optimisation des nanoparticules elles-mêmes, leur association avec un système d'administration adapté pourrait encore en améliorer les performances. L'incorporation des nanoparticules dans un hydrogel thermosensible constitue une approche particulièrement prometteuse. Administré sous forme liquide, ce type de système se gélifie rapidement au contact de la muqueuse nasale, favorisant ainsi une rétention locale et limitant l'élimination par le mécanisme mucociliaire.

Une telle formulation offrirait un double contrôle de la libération : une première étape impliquant la diffusion du trastuzumab hors des nanoparticules, suivie d'une seconde étape impliquant sa diffusion à travers l'hydrogel. L'ajout d'agents favorisant l'absorption, compatibles avec la muqueuse nasale, pourrait également être envisagé pour accroître davantage la biodisponibilité cérébrale.

Une autre approche consiste à explorer des systèmes d'administration. Les complexes de polyélectrolytes (CPE), formés par l'interaction spontanée entre un polycation et un polyanion (tels que le chitosane et le sulfate de dextrane), constituent une alternative prometteuse. Contrairement aux nanoparticules de PLGA préparées par double émulsion, ces systèmes sont produits en milieu aqueux sans recours à des solvants organiques ni à la sonication, des étapes susceptibles de compromettre la stabilité des anticorps. Leur procédé de fabrication est plus simple et facilement transposable à plus grande échelle, ce qui pourrait également faciliter leur futur développement industriel.

L'utilisation du fragment Fab-TZB constitue une seconde stratégie d'optimisation explorée dans cette thèse. Sa masse moléculaire plus faible pourrait permettre une capacité de chargement des nanoparticules plus élevée, tout en préservant la capacité de reconnaissance du récepteur HER2. Par ailleurs, l'absence du domaine Fc pourrait limiter l'interaction avec le récepteur FcRn et réduire l'efflux de l'anticorps hors du compartiment cérébral, favorisant ainsi sa rétention dans le cerveau. Les résultats obtenus restent préliminaires et nécessitent d'être confirmés par des études ultérieures impliquant une gamme plus large de formulations et d'essais biologiques.

Parallèlement à ces travaux de développement galénique, une étude de biodistribution *in vivo* a été initiée chez la souris, avec le double objectif de confirmer la pertinence de cette formulation dans un modèle plus complet que les systèmes *in vitro* et de comparer, dans les mêmes conditions, la voie intranasale à l'administration systémique conventionnelle. Un premier essai de biodistribution intranasale, comparant le TZB libre, les nanoparticules blanches et le NP-TZB à deux temps post-administration (4 h et 24 h), a été effectué, et les échantillons prélevés sont actuellement analysés par ELISA. Simultanément, une approche d'imagerie, basée sur le radiomarquage du TZB,

est développée en collaboration avec l'ICMUB et la plateforme IMATHERA, avec pour objectif à plus long terme le suivi de la biodistribution cérébrale de l'anticorps chez un petit nombre d'animaux. Ce travail, bien que préliminaire, constitue une étape nécessaire à la validation *in vivo* de l'approche développée dans cette thèse et permettra, à terme, de déterminer la contribution de la vectorisation et l'approche N2B par rapport au TZB libre et la voie d'administration conventionnelle, dans des conditions physiologiques complètes.

**En conclusion**, cette thèse visait à évaluer le potentiel d'une stratégie combinant la voie intranasale et des nanoparticules de PLGA pour améliorer la biodistribution cérébrale du trastuzumab dans le traitement des métastases cérébrales HER2-positives. Ces travaux ont démontré la faisabilité de cette approche et identifié les paramètres clés régissant la formulation d'un anticorps monoclonal au sein de nanoparticules polymères.

Les essais d'améliorations ont abouti à une formulation offrant un équilibre satisfaisant entre stabilité colloïdale, taille, efficacité d'encapsulation et capacité de chargement, tout en préservant l'intégrité structurelle et la fonctionnalité du trastuzumab. Cette formulation a présenté une perméabilité nettement améliorée sur un modèle d'épithélium nasal, confirmant ainsi l'intérêt de combiner la voie N2B à un système d'administration par nanoparticules.

Au-delà de ces résultats, la thèse met en lumière les principaux défis restant à relever, notamment l'augmentation de la capacité de chargement, la maîtrise du profil de libération et l'optimisation des propriétés de surface des nanoparticules. Les expériences menées avec le fragment Fab ainsi que les différentes stratégies de formulation explorées ouvrent des perspectives prometteuses pour la poursuite de ces recherches.

Enfin, ce travail dépasse le simple cadre du développement d'une formulation spécifique du trastuzumab. Il propose une approche méthodologique globale, allant de la compréhension des contraintes biologiques de la voie intranasale jusqu'à l'optimisation rationnelle d'un système nanoparticulaire conçu pour acheminer des anticorps thérapeutiques vers le cerveau. Les connaissances acquises pourront être appliquées à d'autres macromolécules biopharmaceutiques et contribuer au développement de nouvelles stratégies d'administration ciblée pour le traitement des affections du système nerveux central.

# BIBLIOGRAPHIE


1. Gribkoff, V.K.; Kaczmarek, L.K. The Need for New Approaches in CNS Drug Discovery: Why Drugs Have Failed, and What Can Be Done to Improve Outcomes. *Neuropharmacology* **2017**, *120*, 11–19, doi:10.1016/j.neuropharm.2016.03.021.
2. Kesselheim, A.S.; Hwang, T.J.; Franklin, J.M. Two Decades of New Drug Development for Central Nervous System Disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**, *14*, 815–816, doi:10.1038/nrd4793.
3. Terstappen, G.C.; Meyer, A.H.; Bell, R.D.; Zhang, W. Strategies for Delivering Therapeutics across the Blood–Brain Barrier. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, *20*, 362–383, doi:10.1038/s41573-021-00139-y.
4. Pardridge, W.M. The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *Neurotherapeutics* **2005**, *2*, 3–14, doi:10.1602/neurorx.2.1.3.
5. St-Amour, I.; Paré, I.; Alata, W.; Coulombe, K.; Ringuette-Goulet, C.; Drouin-Ouellet, J.; Vandal, M.; Soulet, D.; Bazin, R.; Calon, F. Brain Bioavailability of Human Intravenous Immunoglobulin and Its Transport through the Murine Blood–Brain Barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* **2013**, *33*, 1983–1992, doi:10.1038/jcbfm.2013.160.
6. Freskgård, P.-O.; Urich, E. Antibody Therapies in CNS Diseases. *Neuropharmacology* **2017**, *120*, 38–55, doi:10.1016/j.neuropharm.2016.03.014.
7. Lockman, P.R.; Mittapalli, R.K.; Taskar, K.S.; Rudraraju, V.; Gril, B.; Bohn, K.A.; Adkins, C.E.; Roberts, A.; Thorsheim, H.R.; Gaasch, J.A.; et al. Heterogeneous Blood-Tumor Barrier Permeability Determines Drug Efficacy in Experimental Brain Metastases of Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **2010**, *16*, 5664–5678, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1564.
8. Terstappen, G.C.; Meyer, A.H.; Bell, R.D.; Zhang, W. Strategies for Delivering Therapeutics across the Blood–Brain Barrier. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, *20*, 362–383, doi:10.1038/s41573-021-00139-y.
9. Lee, D.; Minko, T. Nanotherapeutics for Nose-to-Brain Drug Delivery: An Approach to Bypass the Blood Brain Barrier. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, doi:10.3390/pharmaceutics13122049.
10. Ménache, M.G.; Hanna, L.M.; Gross, E.A.; Lou, S.R.; Zinreich, S.J.; Leopold, D.A.; Jarabek, A.M.; Miller, F.J. Upper Respiratory Tract Surface Areas and Volumes of Laboratory Animals and Humans: Considerations for Dosimetry Models. *J Toxicol Environ Health* **1997**, *50*, 475–506, doi:10.1080/00984109708984003.
11. Alshawwa, S.Z.; Kassem, A.A.; Farid, R.M.; Mostafa, S.K.; Labib, G.S. Nanocarrier Drug Delivery Systems: Characterization, Limitations, Future Perspectives and Implementation of Artificial Intelligence. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:10.3390/pharmaceutics14040883.
12. Treatment Decisions for Intermediate-Sized Brain Metastases in or near the Motor Cortex among the Neuro-Oncology Community - ScienceDirect Available online: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772529425000979#bib2 (accessed on 31 May 2026).

13. Amsbaugh, M.J.; Kim, C.S. Brain Metastasis. In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing, 2023.
14. Orrantia-Borunda, E.; Anchondo-Nuñez, P.; Acuña-Aguilar, L.E.; Gómez-Valles, F.O.; Ramírez-Valdespino, C.A. Subtypes of Breast Cancer. In *Breast Cancer*; Mayrovitz, H.N., Ed.; Exon Publications: Brisbane (AU), 2022 ISBN 978-0-6453320-3-2.
15. Kim, G.M.; Kim, M.H.; Park, H.S.; Kim, J.H.; Kim, K.H.; Kim, S.-G.; Kim, J.Y.; Park, H.S.; Park, S.; Lee, S.-K.; et al. A Prospective Study for Brain Metastasis Imaging Screening in Patients with Advanced HER2-Positive or Triple-Negative Breast Cancer☆. *ESMO Open* **2026**, *11*, 106892, doi:10.1016/j.esmoop.2026.106892.
16. Lee, J.J.; Loh, K.; Yap, Y.-S. PI3K/Akt/mTOR Inhibitors in Breast Cancer. *Cancer Biol Med* **2015**, *12*, 342–354, doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0089.
17. Li, X.; Huang, T. Advances in the Intrinsic Signaling Pathway Interactions and Clinical Translation of HR+/HER2+ Breast Cancer. *Breast Cancer* **2025**, *32*, 1216–1243, doi:10.1007/s12282-025-01779-3.
18. Zhong, H.; Zhou, Z.; Wang, H.; Wang, R.; Shen, K.; Huang, R.; Wang, Z. The Biological Roles and Clinical Applications of the PI3K/AKT Pathway in Targeted Therapy Resistance in HER2-Positive Breast Cancer: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences* **2024**, *25*, doi:10.3390/ijms252413376.
19. Maadi, H.; Soheilifar, M.H.; Choi, W.-S.; Moshtaghian, A.; Wang, Z. Trastuzumab Mechanism of Action; 20 Years of Research to Unravel a Dilemma. *Cancers* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13143540.
20. Coussy, F.; Bonin, F.; Azorin, P.; Tariq, Z.; Driouch, K. Biologie Des Métastases et Mécanismes Moléculaires de Leur Formation. *Bulletin du Cancer* **2019**, *106*, 24–36, doi:10.1016/j.bulcan.2018.11.010.
21. Gavrilovic, I.T.; Posner, J.B. Brain Metastases: Epidemiology and Pathophysiology. *J Neurooncol* **2005**, *75*, 5–14, doi:10.1007/s11060-004-8093-6.
22. Wang, Y.; Ye, F.; Liang, Y.; Yang, Q. Breast Cancer Brain Metastasis: Insight into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Br J Cancer* **2021**, *125*, 1056–1067, doi:10.1038/s41416-021-01424-8.
23. Goldenberg, M.M. Trastuzumab, a Recombinant DNA-Derived Humanized Monoclonal Antibody, a Novel Agent for the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Clinical Therapeutics* **1999**, *21*, 309–318, doi:10.1016/S0149-2918(00)88288-0.
24. Carpenter, R.L.; Lo, H.-W. Regulation of Apoptosis by HER2 in Breast Cancer. *J Carcinog Mutagen* **2013**, *2013*, 003, doi:10.4172/2157-2518.S7-003.
25. Junttila, T.T.; Akita, R.W.; Parsons, K.; Fields, C.; Lewis Phillips, G.D.; Friedman, L.S.; Sampath, D.; Sliwkowski, M.X. Ligand-Independent HER2/HER3/PI3K Complex Is Disrupted by Trastuzumab and Is Effectively Inhibited by the PI3K Inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 429–440, doi:10.1016/j.ccr.2009.03.020.
26. Bousquet, G.; Darrouzain, F.; de Bazelaire, C.; Ternant, D.; Barranger, E.; Winterman, S.; Madelaine-Chambin, I.; Thiebaut, J.-B.; Polivka, M.; Paintaud, G.; et al. Intrathecal Trastuzumab Halts Progression of CNS Metastases in Breast Cancer. *J Clin Oncol* **2016**, *34*, e151–e155, doi:10.1200/JCO.2012.44.8894.

27. Kabraji, S.; Ni, J.; Lin, N.U.; Xie, S.; Winer, E.P.; Zhao, J.J. Drug Resistance in HER2-Positive Breast Cancer Brain Metastases: Blame the Barrier or the Brain? *Clin Cancer Res* **2018**, *24*, 1795–1804, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3351.
28. Arenhardt, M.P.; Vieira, C.M.; Nogueira-Rodrigues, A. Systemic Therapy Breakthroughs in the Management of Brain Metastases: A New Era for HER2-Positive Breast Cancer. *Cancer Treatment and Research Communications* **2025**, *45*, 100997, doi:10.1016/j.ctarc.2025.100997.
29. Park, I.H.; Ro, J.; Lee, K.S.; Nam, B.H.; Kwon, Y.; Shin, K.H. Trastuzumab Treatment beyond Brain Progression in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Annals of Oncology* **2009**, *20*, 56–62, doi:10.1093/annonc/mdn539.
30. Leyland-Jones, B. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer and Central Nervous System Metastases. *J Clin Oncol* **2009**, *27*, 5278–5286, doi:10.1200/JCO.2008.19.8481.
31. Ramakrishna, N.; Anders, C.K.; Lin, N.U.; Morikawa, A.; Temin, S.; Chandarlapaty, S.; Crews, J.R.; Davidson, N.E.; Franzoi, M.A.B.; Kirshner, J.J.; et al. Management of Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer and Brain Metastases: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol* **2022**, *40*, 2636–2655, doi:10.1200/JCO.22.00520.
32. Duchnowska, R.; Loibl, S.; Jassem, J. Tyrosine Kinase Inhibitors for Brain Metastases in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancer Treatment Reviews* **2018**, *67*, 71–77, doi:10.1016/j.ctrv.2018.05.004.
33. Seagen Inc. *Phase 2 Randomized, Double-Blinded, Controlled Study of Tucatinib vs Placebo in Combination With Capecitabine and Trastuzumab in Patients With Pretreated Unresectable Locally Advanced or Metastatic HER2+ Breast Carcinoma*; clinicaltrials.gov, 2023;
34. Lin, N. *Phase I Dose-Escalation Trial of ARRY-380 in Combination With Trastuzumab in Participants With Brain Metastases From HER2+ Breast Cancer*; clinicaltrials.gov, 2024;
35. Metzger Filho, O.; Leone, J.P.; Li, T.; Tan-Wasielewski, Z.; Trippa, L.; Barry, W.T.; Younger, J.; Lawler, E.; Walker, L.; Freedman, R.A.; et al. Phase I Dose-Escalation Trial of Tucatinib in Combination with Trastuzumab in Patients with HER2-Positive Breast Cancer Brain Metastases. *Annals of Oncology* **2020**, *31*, 1231–1239, doi:10.1016/j.annonc.2020.05.014.
36. Montemurro, F.; Delaloge, S.; Barrios, C.H.; Wuerstlein, R.; Anton, A.; Brain, E.; Hatschek, T.; Kelly, C.M.; Peña-Murillo, C.; Yilmaz, M.; et al. Trastuzumab Emtansine (T-DM1) in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer and Brain Metastases: Exploratory Final Analysis of Cohort 1 from KAMILLA, a Single-Arm Phase IIIb Clinical Trial☆. *Annals of Oncology* **2020**, *31*, 1350–1358, doi:10.1016/j.annonc.2020.06.020.
37. André, F.; Cortés, J.; Curigliano, G.; Modi, S.; Li, W.; Park, Y.H.; Chung, W.-P.; Kim, S.-B.; Yamashita, T.; Pedrini, J.L.; et al. A Pooled Analysis of Trastuzumab Deruxtecan in Patients with Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Positive

Metastatic Breast Cancer with Brain Metastases. *Annals of Oncology* **2024**, *35*, 1169–1180, doi:10.1016/j.annonc.2024.08.2347.
38. Murthy, R.K.; Loi, S.; Okines, A.; Paplomata, E.; Hamilton, E.; Hurvitz, S.A.; Lin, N.U.; Borges, V.; Abramson, V.; Anders, C.; et al. Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* **2020**, *382*, 597–609, doi:10.1056/NEJMoa1914609.
39. Bachelot, T.; Romieu, G.; Campone, M.; Diéras, V.; Cropet, C.; Dalenc, F.; Jimenez, M.; Le Rhun, E.; Pierga, J.-Y.; Gonçalves, A.; et al. Lapatinib plus Capecitabine in Patients with Previously Untreated Brain Metastases from HER2-Positive Metastatic Breast Cancer (LANDSCAPE): A Single-Group Phase 2 Study. *The Lancet Oncology* **2013**, *14*, 64–71, doi:10.1016/S1470-2045(12)70432-1.
40. Saura, C.; Oliveira, M.; Feng, Y.-H.; Dai, M.-S.; Chen, S.-W.; Hurvitz, S.A.; Kim, S.-B.; Moy, B.; Delaloge, S.; Gradishar, W.; et al. Neratinib Plus Capecitabine Versus Lapatinib Plus Capecitabine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Previously Treated With ≥ 2 HER2-Directed Regimens: Phase III NALA Trial. *J Clin Oncol* **2020**, *38*, 3138–3149, doi:10.1200/JCO.20.00147.
41. Montemurro, F.; Delaloge, S.; Barrios, C.H.; Wuerstlein, R.; Anton, A.; Brain, E.; Hatschek, T.; Kelly, C.M.; Peña-Murillo, C.; Yilmaz, M.; et al. Trastuzumab Emtansine (T-DM1) in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer and Brain Metastases: Exploratory Final Analysis of Cohort 1 from KAMILLA, a Single-Arm Phase IIIb Clinical Trial☆. *Annals of Oncology* **2020**, *31*, 1350–1358, doi:10.1016/j.annonc.2020.06.020.
42. Bartsch, R.; Berghoff, A.S.; Furtner, J.; Marhold, M.; Bergen, E.S.; Roider-Schur, S.; Starzer, A.M.; Forstner, H.; Rottenmanner, B.; Dieckmann, K.; et al. Trastuzumab Deruxtecan in HER2-Positive Breast Cancer with Brain Metastases: A Single-Arm, Phase 2 Trial. *Nat Med* **2022**, *28*, 1840–1847, doi:10.1038/s41591-022-01935-8.
43. Vaz Batista, M.; Pérez-García, J.M.; Garrigós, L.; García-Sáenz, J.Á.; Cortez, P.; Racca, F.; Blanch, S.; Ruiz-Borrego, M.; Fernández-Ortega, A.; Fernández-Abad, M.; et al. The DEBBRAH Trial: Trastuzumab Deruxtecan in HER2-Positive and HER2-Low Breast Cancer Patients with Leptomeningeal Carcinomatosis. *Med* **2025**, *6*, 100502, doi:10.1016/j.medj.2024.08.001.
44. André, F.; Cortés, J.; Curigliano, G.; Modi, S.; Li, W.; Park, Y.H.; Chung, W.-P.; Kim, S.-B.; Yamashita, T.; Pedrini, J.L.; et al. A Pooled Analysis of Trastuzumab Deruxtecan in Patients with Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Positive Metastatic Breast Cancer with Brain Metastases. *Annals of Oncology* **2024**, *35*, 1169–1180, doi:10.1016/j.annonc.2024.08.2347.
45. Arenhardt, M.P.; Vieira, C.M.; Nogueira-Rodrigues, A. Systemic Therapy Breakthroughs in the Management of Brain Metastases: A New Era for HER2-Positive Breast Cancer. *Cancer Treatment and Research Communications* **2025**, *45*, 100997, doi:10.1016/j.ctarc.2025.100997.
46. Daneman, R.; Prat, A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2015**, *7*, a020412, doi:10.1101/cshperspect.a020412.

47. Cipolla, M.J. Barriers of the CNS. In *The Cerebral Circulation*; Morgan & Claypool Life Sciences, 2009.
48. Abbott, N.J.; Patabendige, A.A.K.; Dolman, D.E.M.; Yusof, S.R.; Begley, D.J. Structure and Function of the Blood–Brain Barrier. *Neurobiology of Disease* **2010**, *37*, 13–25, doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030.
49. Partridge, B.; Eardley, A.; Morales, B.E.; Campelo, S.N.; Lorenzo, M.F.; Mehta, J.N.; Kani, Y.; Mora, J.K.G.; Campbell, E.-O.Y.; Arena, C.B.; et al. Advancements in Drug Delivery Methods for the Treatment of Brain Disease. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, doi:10.3389/fvets.2022.1039745.
50. Wichmann, T.O.; Damkier, H.H.; Pedersen, M. A Brief Overview of the Cerebrospinal Fluid System and Its Implications for Brain and Spinal Cord Diseases. *Front. Hum. Neurosci.* **2022**, *15*, doi:10.3389/fnhum.2021.737217.
51. Czarniak, N.; Kamińska, J.; Matowicka-Karna, J.; Koper-Lenkiewicz, O.M. Cerebrospinal Fluid–Basic Concepts Review. *Biomedicines* **2023**, *11*, 1461, doi:10.3390/biomedicines11051461.
52. Hladky, S.B.; Barrand, M.A. Mechanisms of Fluid Movement into, through and out of the Brain: Evaluation of the Evidence. *Fluids and Barriers of the CNS* **2014**, *11*, 26, doi:10.1186/2045-8118-11-26.
53. Nilsson, C.; Stahlberg, F.; Thomsen, C.; Henriksen, O.; Herning, M.; Owman, C. Circadian Variation in Human Cerebrospinal Fluid Production Measured by Magnetic Resonance Imaging. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **1992**, doi:10.1152/ajpregu.1992.262.1.R20.
54. Naseri Kouzehgarani, G.; Feldsien, T.; Engelhard, H.H.; Mirakhur, K.K.; Phipps, C.; Nimmrich, V.; Clausznitzer, D.; Lefebvre, D.R. Harnessing Cerebrospinal Fluid Circulation for Drug Delivery to Brain Tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2021**, *173*, 20–59, doi:10.1016/j.addr.2021.03.002.
55. Pardridge, W.M. Drug Transport in Brain via the Cerebrospinal Fluid. *Fluids Barriers CNS* **2011**, *8*, 7, doi:10.1186/2045-8118-8-7.
56. Pestalozzi, B.C.; Brignoli, S. Trastuzumab in CSF. *J Clin Oncol* **2000**, *18*, 2349–2351, doi:10.1200/JCO.2000.18.11.2349.
57. Schlachetzki, F.; Zhu, C.; Pardridge, W.M. Expression of the Neonatal Fc Receptor (FcRn) at the Blood–Brain Barrier. *Journal of Neurochemistry* **2002**, *81*, 203–206, doi:10.1046/j.1471-4159.2002.00840.x.
58. Blasberg, R.G.; Patlak, C.; Fenstermacher, J.D. Intrathecal Chemotherapy: Brain Tissue Profiles after Ventriculocisternal Perfusion. *J Pharmacol Exp Ther* **1975**, *195*, 73–83.
59. Pardridge, W.M. Drug Transport in Brain via the Cerebrospinal Fluid. *Fluids Barriers CNS* **2011**, *8*, 7, doi:10.1186/2045-8118-8-7.
60. Nag, S.; David J, B. Blood Brain Barrier, Exchange of Metabolites and Gases. In *Pathology and Genetics: Cerebrovascular Diseases*; Kalimo, H., Ed.; ISN Neuropath Press: Basel, 2005; pp. 22–29.
61. Galea, I. The Blood–Brain Barrier in Systemic Infection and Inflammation. *Cell Mol Immunol* **2021**, *18*, 2489–2501, doi:10.1038/s41423-021-00757-x.

62. Daneman, R.; Prat, A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2015**, *7*, a020412, doi:10.1101/cshperspect.a020412.
63. Kadry, H.; Noorani, B.; Cucullo, L. A Blood–Brain Barrier Overview on Structure, Function, Impairment, and Biomarkers of Integrity. *Fluids Barriers CNS* **2020**, *17*, 69, doi:10.1186/s12987-020-00230-3.
64. Langen, U.H.; Ayloo, S.; Gu, C. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2019**, *35*, 591–613, doi:10.1146/annurev-cellbio-100617-062608.
65. Betz, A.L.; Firth, J.A.; Goldstein, G.W. Polarity of the Blood-Brain Barrier: Distribution of Enzymes between the Luminal and Antiluminal Membranes of Brain Capillary Endothelial Cells. *Brain Res* **1980**, *192*, 17–28, doi:10.1016/0006-8993(80)91004-5.
66. Oldendorf, W.H.; Cornford, M.E.; Brown, W.J. The Large Apparent Work Capability of the Blood-Brain Barrier: A Study of the Mitochondrial Content of Capillary Endothelial Cells in Brain and Other Tissues of the Rat. *Annals of Neurology* **1977**, *1*, 409–417, doi:10.1002/ana.410010502.
67. Zaragozá, R. Transport of Amino Acids Across the Blood-Brain Barrier. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fphys.2020.00973.
68. Biali, M.E.; Auvity, S.; Cisternino, S.; Smirnova, M.; Hacker, M.; Zeitlinger, M.; Mairinger, S.; Tournier, N.; Bauer, M.; Langer, O. Dissimilar Effect of P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein Inhibition on the Distribution of Erlotinib to the Retina and Brain in Humans and Mice. *Mol Pharm* **2023**, *20*, 5877–5887, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.3c00715.
69. Begley, D.J.; Brightman, M.W. Structural and Functional Aspects of the Blood-Brain Barrier. In *Peptide Transport and Delivery into the Central Nervous System*; Prokai, L., Prokai-Tatrai, K., Eds.; Birkhäuser: Basel, 2003; pp. 39–78 ISBN 978-3-0348-8049-7.
70. Kadry, H.; Noorani, B.; Cucullo, L. A Blood–Brain Barrier Overview on Structure, Function, Impairment, and Biomarkers of Integrity. *Fluids Barriers CNS* **2020**, *17*, 69, doi:10.1186/s12987-020-00230-3.
71. Kolinko, Y.; Kralickova, M.; Tonar, Z. The Impact of Pericytes on the Brain and Approaches for Their Morphological Analysis. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **2018**, *91*, 35–45, doi:10.1016/j.jchemneu.2018.04.003.
72. Dore-Duffy, P.; Cleary, K. Morphology and Properties of Pericytes. In *The Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols*; Nag, S., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp. 49–68 ISBN 978-1-60761-938-3.
73. Winkler, E.A.; Bell, R.D.; Zlokovic, B.V. Central Nervous System Pericytes in Health and Disease. *Nat Neurosci* **2011**, *14*, 1398–1405, doi:10.1038/nn.2946.
74. Brown, L.S.; Foster, C.G.; Courtney, J.-M.; King, N.E.; Howells, D.W.; Sutherland, B.A. Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, doi:10.3389/fncel.2019.00282.
75. Pandit, R.; Chen, L.; Götz, J. The Blood-Brain Barrier: Physiology and Strategies for Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2020**, *165–166*, 1–14, doi:10.1016/j.addr.2019.11.009.

76. Daneman, R.; Zhou, L.; Kebede, A.A.; Barres, B.A. Pericytes Are Required for Blood-Brain Barrier Integrity during Embryogenesis. *Nature* **2010**, *468*, 562–566, doi:10.1038/nature09513.
77. Daneman, R.; Prat, A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2015**, *7*, a020412, doi:10.1101/cshperspect.a020412.
78. Abbott, N.J.; Rönnbäck, L.; Hansson, E. Astrocyte–Endothelial Interactions at the Blood–Brain Barrier. *Nat Rev Neurosci* **2006**, *7*, 41–53, doi:10.1038/nrn1824.
79. Sorokin, L. The Impact of the Extracellular Matrix on Inflammation. *Nat Rev Immunol* **2010**, *10*, 712–723, doi:10.1038/nri2852.
80. Du, F.; Shusta, E.V.; Palecek, S.P. Extracellular Matrix Proteins in Construction and Function of *in vitro* Blood-Brain Barrier Models. *Front. Chem. Eng.* **2023**, *5*, doi:10.3389/fceng.2023.1130127.
81. Langen, U.H.; Ayloo, S.; Gu, C. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2019**, *35*, 591–613, doi:10.1146/annurev-cellbio-100617-062608.
82. Kefalides, N.A. Basement Membranes: Structure Function Relationships. *Renal Physiology* **2008**, *4*, 57–66, doi:10.1159/000172806.
83. Gasche, Y.; Soccal, P.M.; Kanemitsu, M.; Copin, J.-C. Matrix Metalloproteinases and Diseases of the Central Nervous System with a Special Emphasis on Ischemic Brain. *Front Biosci* **2006**, *11*, 1289–1301, doi:10.2741/1883.
84. Jin, J.; Fang, F.; Gao, W.; Chen, H.; Wen, J.; Wen, X.; Chen, J. The Structure and Function of the Glycocalyx and Its Connection With Blood-Brain Barrier. *Front. Cell. Neurosci.* **2021**, *15*, doi:10.3389/fncel.2021.739699.
85. Tarbell, J.M. Shear Stress and the Endothelial Transport Barrier. *Cardiovasc Res* **2010**, *87*, 320–330, doi:10.1093/cvr/cvq146.
86. Koo, A.; Dewey, C.F.; García-Cardeña, G. Hemodynamic Shear Stress Characteristic of Atherosclerosis-Resistant Regions Promotes Glycocalyx Formation in Cultured Endothelial Cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2013**, *304*, C137–C146, doi:10.1152/ajpcell.00187.2012.
87. Salmon, A.H.; Satchell, S.C. Endothelial Glycocalyx Dysfunction in Disease: Albuminuria and Increased Microvascular Permeability. *The Journal of Pathology* **2012**, *226*, 562–574, doi:10.1002/path.3964.
88. Kolářová, H.; Víteček, J.; Černá, A.; Černík, M.; Přibyl, J.; Skládal, P.; Potěšil, D.; Ihnatová, I.; Zdráhal, Z.; Hampl, A.; et al. Myeloperoxidase Mediated Alteration of Endothelial Function Is Dependent on Its Cationic Charge. *Free Radical Biology and Medicine* **2021**, *162*, 14–26, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.008.
89. Butler, M.J.; Down, C.J.; Foster, R.R.; Satchell, S.C. The Pathological Relevance of Increased Endothelial Glycocalyx Permeability. *The American Journal of Pathology* **2020**, *190*, 742–751, doi:10.1016/j.ajpath.2019.11.015.
90. Lipowsky, H.H.; Sah, R.; Lescanic, A. Relative Roles of Doxycycline and Cation Chelation in Endothelial Glycan Shedding and Adhesion of Leukocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2011**, *300*, H415–H422, doi:10.1152/ajpheart.00923.2010.

91. Langen, U.H.; Ayloo, S.; Gu, C. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2019**, *35*, 591–613, doi:10.1146/annurev-cellbio-100617-062608.
92. Terstappen, G.C.; Meyer, A.H.; Bell, R.D.; Zhang, W. Strategies for Delivering Therapeutics across the Blood–Brain Barrier. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, *20*, 362–383, doi:10.1038/s41573-021-00139-y.
93. Abbott, N.J.; Patabendige, A.A.K.; Dolman, D.E.M.; Yusof, S.R.; Begley, D.J. Structure and Function of the Blood–Brain Barrier. *Neurobiology of Disease* **2010**, *37*, 13–25, doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030.
94. Wu, D.; Chen, Q.; Chen, X.; Han, F.; Chen, Z.; Wang, Y. The Blood–Brain Barrier: Structure, Regulation, and Drug Delivery. *Sig Transduct Target Ther* **2023**, *8*, 1–27, doi:10.1038/s41392-023-01481-w.
95. Transcytosis of Macromolecules at the Blood–Brain Barrier. In *Advances in Pharmacology*; Academic Press, 2014; Vol. 71, pp. 147–163.
96. Strazielle, N.; Ghersi-Egea, J.F. Physiology of Blood–Brain Interfaces in Relation to Brain Disposition of Small Compounds and Macromolecules. *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 1473–1491, doi:10.1021/mp300518e.
97. Johanson, C.E.; Stopa, E.G.; McMillan, P.N. The Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier: Structure and Functional Significance. In *The Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols*; Nag, S., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp. 101–131 ISBN 978-1-60761-938-3.
98. Johanson, C.E.; Stopa, E.G.; McMillan, P.N. The Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier: Structure and Functional Significance. In *The Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols*; Nag, S., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp. 101–131 ISBN 978-1-60761-938-3.
99. Zhang, Y.; Pardridge, W.M. Mediated Efflux of IgG Molecules from Brain to Blood across the Blood–Brain Barrier. *Journal of Neuroimmunology* **2001**, *114*, 168–172, doi:10.1016/S0165-5728(01)00242-9.
100. Raghavan, M.; Bonagura, V.R.; Morrison, S.L.; Bjorkman, P.J. Analysis of the pH Dependence of the Neonatal Fc Receptor/Immunoglobulin G Interaction Using Antibody and Receptor Variants. *Biochemistry* **1995**, *34*, 14649–14657, doi:10.1021/bi00045a005.
101. Vaughn, D.E.; Bjorkman, P.J. Structural Basis of pH-Dependent Antibody Binding by the Neonatal Fc Receptor. *Structure* **1998**, *6*, 63–73, doi:10.1016/S0969-2126(98)00008-2.
102. Roopenian, D.C.; Akilesh, S. FcRn: The Neonatal Fc Receptor Comes of Age. *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 715–725, doi:10.1038/nri2155.
103. Magdelaine-Beuzelin, C.; Ohresser, M.; Watier, H. FcRn, un récepteur d'IgG aux multiples facettes. *Med Sci (Paris)* **2009**, *25*, 1053–1056, doi:10.1051/medsci/200925121053.
104. Kim, J.; Hayton, W.L.; Robinson, J.M.; Anderson, C.L. Kinetics of FcRn-Mediated Recycling of IgG and Albumin in Human: Pathophysiology and Therapeutic

Implications Using a Simplified Mechanism-Based Model. *Clin Immunol* **2007**, *122*, 146–155, doi:10.1016/j.clim.2006.09.001.
105. Cooper, P.R.; Ciambrone, G.J.; Kliwinski, C.M.; Maze, E.; Johnson, L.; Li, Q.; Feng, Y.; Hornby, P.J. Efflux of Monoclonal Antibodies from Rat Brain by Neonatal Fc Receptor, FcRn. *Brain Research* **2013**, *1534*, 13–21, doi:10.1016/j.brainres.2013.08.035.
106. Garg, A.; Balthasar, J.P. Investigation of the Influence of FcRn on the Distribution of IgG to the Brain. *AAPS J* **2009**, *11*, 553–557, doi:10.1208/s12248-009-9129-9.
107. Abuqayyas, L.; Balthasar, J.P. Investigation of the Role of FcγR and FcRn in mAb Distribution to the Brain. *Mol Pharm* **2013**, *10*, 1505–1513, doi:10.1021/mp300214k.
108. Ruano-Salguero, J.S.; Lee, K.H. Antibody Transcytosis across Brain Endothelial-like Cells Occurs Nonspecifically and Independent of FcRn. *Sci Rep* **2020**, *10*, 3685, doi:10.1038/s41598-020-60438-z.
109. Pardridge, W.M. The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *Neurotherapeutics* **2005**, *2*, 3–14, doi:10.1602/neurorx.2.1.3.
110. Pardridge, W.M. Receptor-Mediated Drug Delivery of Bispecific Therapeutic Antibodies through the Blood-Brain Barrier. *Front Drug Deliv* **2023**, *3*, 1227816, doi:10.3389/fddev.2023.1227816.
111. Yadav, D.B.; Maloney, J.A.; Wildsmith, K.R.; Fuji, R.N.; Meilandt, W.J.; Solanoy, H.; Lu, Y.; Peng, K.; Wilson, B.; Chan, P.; et al. Widespread Brain Distribution and Activity Following i.c.v. Infusion of Anti-β-Secretase (BACE1) in Nonhuman Primates. *British Journal of Pharmacology* **2017**, *174*, 4173–4185, doi:10.1111/bph.14021.
112. Elsinga, P.H.; Hendrikse, N.H.; Bart, J.; Vaalburg, W.; Waarde, A. van PET Studies on P-Glycoprotein Function in the Blood-Brain Barrier: How It Affects Uptake and Binding of Drugs within the CNS. *Current Pharmaceutical Design 10*, 1493–1503, doi:10.2174/1381612043384736.
113. Dauchy, S.; Dutheil, F.; Weaver, R.J.; Chassoux, F.; Daumas-Duport, C.; Couraud, P.-O.; Scherrmann, J.-M.; De Waziers, I.; Declèves, X. ABC Transporters, Cytochromes P450 and Their Main Transcription Factors: Expression at the Human Blood–Brain Barrier. *Journal of Neurochemistry* **2008**, *107*, 1518–1528, doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05720.x.
114. Arvanitis, C.D.; Ferraro, G.B.; Jain, R.K. The Blood–Brain Barrier and Blood–Tumour Barrier in Brain Tumours and Metastases. *Nat Rev Cancer* **2020**, *20*, 26–41, doi:10.1038/s41568-019-0205-x.
115. Steeg, P.S. The Blood–Tumour Barrier in Cancer Biology and Therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **2021**, *18*, 696–714, doi:10.1038/s41571-021-00529-6.
116. Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res* **1986**, *46*, 6387–6392.
117. Maeda, H. Toward a Full Understanding of the EPR Effect in Primary and Metastatic Tumors as Well as Issues Related to Its Heterogeneity. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2015**, *91*, 3–6, doi:10.1016/j.addr.2015.01.002.

118. Angeli, E.; Nguyen, T.T.; Janin, A.; Bousquet, G. How to Make Anticancer Drugs Cross the Blood–Brain Barrier to Treat Brain Metastases. *Int J Mol Sci* **2019**, *21*, 22, doi:10.3390/ijms21010022.
119. Lockman, P.R.; Mittapalli, R.K.; Taskar, K.S.; Rudraraju, V.; Gril, B.; Bohn, K.A.; Adkins, C.E.; Roberts, A.; Thorsheim, H.R.; Gaasch, J.A.; et al. Heterogeneous Blood–Tumor Barrier Permeability Determines Drug Efficacy in Experimental Brain Metastases of Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **2010**, *16*, 5664–5678, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1564.
120. Haddad, F.; Sawalha, M.; Khawaja, Y.; Najjar, A.; Karaman, R. Dopamine and Levodopa Prodrugs for the Treatment of Parkinson's Disease. *Molecules* **2017**, *23*, doi:10.3390/molecules23010040.
121. Pardridge, W.M. Receptor-Mediated Peptide Transport through the Blood-Brain Barrier. *Endocr Rev* **1986**, *7*, 314–330, doi:10.1210/edrv-7-3-314.
122. Pardridge, W.M. BLOOD-BRAIN BARRIER DRUG TARGETING: THE FUTURE OF BRAIN DRUG DEVELOPMENT. *Molecular Interventions* **2003**, *3*, 90, doi:10.1124/mi.3.2.90.
123. Engineering and Pharmacology of Blood–Brain Barrier-Permeable Bispecific Antibodies. In *Advances in Pharmacology*; Academic Press, 2014; Vol. 71, pp. 301–335.
124. Yu, Y.J.; Zhang, Y.; Kenrick, M.; Hoyte, K.; Luk, W.; Lu, Y.; Atwal, J.; Elliott, J.M.; Prabhu, S.; Watts, R.J.; et al. Boosting Brain Uptake of a Therapeutic Antibody by Reducing Its Affinity for a Transcytosis Target. *Science Translational Medicine* **2011**, *3*, 84ra44-84ra44, doi:10.1126/scitranslmed.3002230.
125. Zhao, Z.; Zlokovic, B.V. Therapeutic TVs for Crossing Barriers in the Brain. *Cell* **2020**, *182*, 267–269, doi:10.1016/j.cell.2020.06.041.
126. Gabathuler, R.; Vitalis, T.Z.; Nounou, M.I.; Iqbal, U.; Moreno, M.; Adkins, C.E.; Torrell, T.O.; Jefferies, W.A.; Lockman, P.R. Abstract A247: BT2111, a New Anticancer Agent Composed of Trastuzumab and Transcend a Vector for Brain Delivery for the Treatment of Metastatic Her2+ Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* **2013**, *12*, A247, doi:10.1158/1535-7163.TARG-13-A247.
127. Angeli, E.; Paris, J.; Le Tilly, O.; Desvignes, C.; Gapihan, G.; Boquet, D.; Pamoukdjian, F.; Hamdan, D.; Rigal, M.; Poirier, F.; et al. A Fab of Trastuzumab to Treat HER2 Overexpressing Breast Cancer Brain Metastases. *Exp Hematol Oncol* **2024**, *13*, 41, doi:10.1186/s40164-024-00513-7.
128. Couvreur, P. Nanomédicaments pour le traitement de maladies graves et recherches duales. *Comptes Rendus. Biologies* **2024**, *347*, 187–198, doi:10.5802/crbiol.168.
129. Nanomédicaments contre le cancer | CultureSciences-Chimie Available online: https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-des-materiaux/nanomedicaments-contre-le-cancer (accessed on 7 June 2026).
130. Terstappen, G.C.; Meyer, A.H.; Bell, R.D.; Zhang, W. Strategies for Delivering Therapeutics across the Blood–Brain Barrier. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, *20*, 362–383, doi:10.1038/s41573-021-00139-y.

131. Saraiva, C.; Praça, C.; Ferreira, R.; Santos, T.; Ferreira, L.; Bernardino, L. Nanoparticle-Mediated Brain Drug Delivery: Overcoming Blood–Brain Barrier to Treat Neurodegenerative Diseases. *Journal of Controlled Release* **2016**, *235*, 34–47, doi:10.1016/j.jconrel.2016.05.044.
132. Sarkar, A.; Fatima, I.; Jamal, Q.M.S.; Sayeed, U.; Khan, M.K.A.; Akhtar, S.; Kamal, M.A.; Farooqui, A.; Siddiqui, M.H. Nanoparticles as a Carrier System for Drug Delivery Across Blood Brain Barrier. *Curr Drug Metab* **2017**, *18*, 129–137, doi:10.2174/1389200218666170113125132.
133. Wang, C.; Xue, Y.; Markovic, T.; Li, H.; Wang, S.; Zhong, Y.; Du, S.; Zhang, Y.; Hou, X.; Yu, Y.; et al. Blood–Brain-Barrier-Crossing Lipid Nanoparticles for mRNA Delivery to the Central Nervous System. *Nat. Mater.* **2025**, *24*, 1653–1663, doi:10.1038/s41563-024-02114-5.
134. Li, H.; Tong, Y.; Bai, L.; Ye, L.; Zhong, L.; Duan, X.; Zhu, Y. Lactoferrin Functionalized PEG-PLGA Nanoparticles of Shikonin for Brain Targeting Therapy of Glioma. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *107*, 204–211, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.155.
135. Kinoshita, M.; Hynynen, K. A Novel Method for the Intracellular Delivery of siRNA Using Microbubble-Enhanced Focused Ultrasound. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *335*, 393–399, doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.101.
136. Sheikov, N.; McDannold, N.; Vykhodtseva, N.; Jolesz, F.; Hynynen, K. Cellular Mechanisms of the Blood-Brain Barrier Opening Induced by Ultrasound in Presence of Microbubbles. *Ultrasound in Medicine & Biology* **2004**, *30*, 979–989, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2004.04.010.
137. Schlicher, R.K.; Radhakrishna, H.; Tolentino, T.P.; Apkarian, R.P.; Zarnitsyn, V.; Prausnitz, M.R. Mechanism of Intracellular Delivery by Acoustic Cavitation. *Ultrasound in Medicine & Biology* **2006**, *32*, 915–924, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2006.02.1416.
138. Helfield, B.; Chen, X.; Watkins, S.C.; Villanueva, F.S. Biophysical Insight into Mechanisms of Sonoporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113*, 9983–9988, doi:10.1073/pnas.1606915113.
139. Kinoshita, M.; McDannold, N.; Jolesz, F.A.; Hynynen, K. Targeted Delivery of Antibodies through the Blood–Brain Barrier by MRI-Guided Focused Ultrasound. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2006**, *340*, 1085–1090, doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.112.
140. Liu, H.-L.; Hua, M.-Y.; Chen, P.-Y.; Chu, P.-C.; Pan, C.-H.; Yang, H.-W.; Huang, C.-Y.; Wang, J.-J.; Yen, T.-C.; Wei, K.-C. Blood-Brain Barrier Disruption with Focused Ultrasound Enhances Delivery of Chemotherapeutic Drugs for Glioblastoma Treatment. *Radiology* **2010**, *255*, 415–425, doi:10.1148/radiol.10090699.
141. Meng, Y.; Reilly, R.M.; Pezo, R.C.; Trudeau, M.; Sahgal, A.; Singnurkar, A.; Perry, J.; Myrehaug, S.; Pople, C.B.; Davidson, B.; et al. MR-Guided Focused Ultrasound Enhances Delivery of Trastuzumab to Her2-Positive Brain Metastases. *Science Translational Medicine* **2021**, *13*, eabj4011, doi:10.1126/scitranslmed.abj4011.

142. Rapoport, S.I. Osmotic Opening of the Blood–Brain Barrier: Principles, Mechanism, and Therapeutic Applications. *Cell Mol Neurobiol* **2000**, *20*, 217–230, doi:10.1023/A:1007049806660.
143. C, C.; A, J.; Wg, L.; Am, T.; X, L.; Rm, L.; S, L.; Pc, S.; G, L.; M, P.; et al. Optimization of Osmotic Blood-Brain Barrier Opening to Enable Intravital Microscopy Studies on Drug Delivery in Mouse Cortex. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2020**, *317*, doi:10.1016/j.jconrel.2019.11.019.
144. Latulippe, J.; Fortin, D.; Gobeil, F. Kinin Agonists as a Means to Increase Blood–Brain Barrier Permeability of Drugs. *Bradykinin* **2025**, 369–400.
145. Limia, C.G.; Baird, M.; Schwartz, M.; Saxena, S.; Meyer, K.; Wein, N. Emerging Perspectives on Gene Therapy Delivery for Neurodegenerative and Neuromuscular Disorders. *Journal of Personalized Medicine* **2022**, *12*, doi:10.3390/jpm12121979.
146. Lee, G.Y.; Glicksman, M.A.; Patel, R.; Malhotra, S.; Moelis, N.; Vanjani, N.N.; Kumthekar, P. Retrospective Review of Intra-Cerebrospinal Fluid (CSF) Drug Delivery in CNS Malignancies: Safety, Clinical Efficacy and Pharmacokinetic Profiles of Intracerebroventricular (ICV), Lumbar Intrathecal (LIT), and Intra-Cisterna Magna (ICM) Injections. *Cancers (Basel)* **2025**, *17*, 1263, doi:10.3390/cancers17081263.
147. Ajeeb, R.; Clegg, J.R. Intrathecal Delivery of Macromolecules: Clinical Status and Emerging Technologies. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2023**, *199*, 114949, doi:10.1016/j.addr.2023.114949.
148. Pardridge, W.M. A Historical Review of Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:10.3390/pharmaceutics14061283.
149. Zagouri, F.; Sergentanis, T.N.; Bartsch, R.; Berghoff, A.S.; Chrysikos, D.; de Azambuja, E.; Dimopoulos, M.-A.; Preusser, M. Intrathecal Administration of Trastuzumab for the Treatment of Meningeal Carcinomatosis in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Pooled Analysis. *Breast Cancer Res Treat* **2013**, *139*, 13–22, doi:10.1007/s10549-013-2525-y.
150. Mak, M.; Fung, L.; Strasser, J.F.; Saltzman, W.M. Distribution of Drugs Following Controlled Delivery to the Brain Interstitium. *J Neuro-Oncol* **1995**, *26*, 91–102, doi:10.1007/BF01060215.
151. Morrison, P.F.; Laske, D.W.; Bobo, H.; Oldfield, E.H.; Dedrick, R.L. High-Flow Microinfusion: Tissue Penetration and Pharmacodynamics. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **1994**, *266*, R292–R305, doi:10.1152/ajpregu.1994.266.1.R292.
152. Gizurarson, S. Anatomical and Histological Factors Affecting Intranasal Drug and Vaccine Delivery. *Curr Drug Deliv* **2012**, *9*, 566–582, doi:10.2174/156720112803529828.
153. Bourganis, V.; Kammona, O.; Alexopoulos, A.; Kiparissides, C. Recent Advances in Carrier Mediated Nose-to-Brain Delivery of Pharmaceutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2018**, *128*, 337–362, doi:10.1016/j.ejpb.2018.05.009.
154. Pardeshi, C.V.; Belgamwar, V.S. Direct Nose to Brain Drug Delivery via Integrated Nerve Pathways Bypassing the Blood–Brain Barrier: An Excellent Platform for Brain

Targeting. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2013**, *10*, 957–972, doi:10.1517/17425247.2013.790887.
155. Illum, L. Transport of Drugs from the Nasal Cavity to the Central Nervous System. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, *11*, 1–18, doi:10.1016/S0928-0987(00)00087-7.
156. Bourganis, V.; Kammona, O.; Alexopoulos, A.; Kiparissides, C. Recent Advances in Carrier Mediated Nose-to-Brain Delivery of Pharmaceutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2018**, *128*, 337–362, doi:10.1016/j.ejpb.2018.05.009.
157. Gizurarson, S. Anatomical and Histological Factors Affecting Intranasal Drug and Vaccine Delivery. *Curr Drug Deliv* **2012**, *9*, 566–582, doi:10.2174/156720112803529828.
158. Harkema, J.R.; Carey, S.A.; Wagner, J.G. The Nose Revisited: A Brief Review of the Comparative Structure, Function, and Toxicologic Pathology of the Nasal Epithelium. *Toxicol Pathol* **2006**, *34*, 252–269, doi:10.1080/01926230600713475.
159. Selvaraj, K.; Gowthamarajan, K.; Karri, V.V.S.R. Nose to Brain Transport Pathways an Overview: Potential of Nanostructured Lipid Carriers in Nose to Brain Targeting. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2018**, *46*, 2088–2095, doi:10.1080/21691401.2017.1420073.
160. Gänger, S.; Schindowski, K. Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, doi:10.3390/pharmaceutics10030116.
161. Thorne, R.G.; Pronk, G.J.; Padmanabhan, V.; Frey, W.H. Delivery of Insulin-like Growth Factor-I to the Rat Brain and Spinal Cord along Olfactory and Trigeminal Pathways Following Intranasal Administration. *Neuroscience* **2004**, *127*, 481–496, doi:10.1016/j.neuroscience.2004.05.029.
162. Spindler, L.M.; Feuerhake, A.; Ladel, S.; Günday, C.; Flamm, J.; Günday-Türeli, N.; Türeli, E.; Tovar, G.E.M.; Schindowski, K.; Gruber-Traub, C. Nano-in-Micro-Particles Consisting of PLGA Nanoparticles Embedded in Chitosan Microparticles via Spray-Drying Enhances Their Uptake in the Olfactory Mucosa. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fphar.2021.732954.
163. Fortuna, A.; Schindowski, K.; Sonvico, F. Editorial: Intranasal Drug Delivery: Challenges and Opportunities. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, doi:10.3389/fphar.2022.868986.
164. Kumar, N.N.; Gautam, M.; Lochhead, J.J.; Wolak, D.J.; Ithapu, V.; Singh, V.; Thorne, R.G. Relative Vascular Permeability and Vascularity across Different Regions of the Rat Nasal Mucosa: Implications for Nasal Physiology and Drug Delivery. *Sci Rep* **2016**, *6*, 31732, doi:10.1038/srep31732.
165. Wu, H.; Hu, K.; Jiang, X. From Nose to Brain: Understanding Transport Capacity and Transport Rate of Drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2008**, *5*, 1159–1168, doi:10.1517/17425247.5.10.1159.

166. Sakane, T.; Akizuki, M.; Taki, Y.; Yamashita, S.; Sezaki, H.; Nadai, T. Direct Drug Transport from the Rat Nasal Cavity to the Cerebrospinal Fluid: The Relation to the Molecular Weight of Drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1995**, *47*, 379–381, doi:10.1111/j.2042-7158.1995.tb05814.x.
167. Ladel, S.; Maigler, F.; Flamm, J.; Schlossbauer, P.; Handl, A.; Hermann, R.; Herzog, H.; Hummel, T.; Mizaikoff, B.; Schindowski, K. Impact of Glycosylation and Species Origin on the Uptake and Permeation of IgGs through the Nasal Airway Mucosa. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1014, doi:10.3390/pharmaceutics12111014.
168. Ladel, S.; Schlossbauer, P.; Flamm, J.; Luksch, H.; Mizaikoff, B.; Schindowski, K. Improved *In vitro* Model for Intranasal Mucosal Drug Delivery: Primary Olfactory and Respiratory Epithelial Cells Compared with the Permanent Nasal Cell Line RPMI 2650. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 367, doi:10.3390/pharmaceutics11080367.
169. Correa, D.; Scheuber, M.I.; Shan, H.; Weinmann, O.W.; Baumgartner, Y.A.; Harten, A.; Wahl, A.-S.; Skaar, K.L.; Schwab, M.E. Intranasal Delivery of Full-Length Anti-Nogo-A Antibody: A Potential Alternative Route for Therapeutic Antibodies to Central Nervous System Targets. *Proc Natl Acad Sci U S A 120*, e2200057120, doi:10.1073/pnas.2200057120.
170. Kengne Kamkui, L.; Disdier, C.; Herbet, A.; Costa, N.; Guyot, A.-C.; Boquet, D.; Mabondzo, A. *In vitro* Evaluation of the Efficient Passage of PLGA-Formulated Trastuzumab for Nose-to-Brain Delivery. *Pharmaceutics* **2025**, *17*, 681, doi:10.3390/pharmaceutics17060681.
171. Nath, A.; Johnson, T.P. Mechanisms of Viral Persistence in the Brain and Therapeutic Approaches. *The FEBS Journal* **2022**, *289*, 2145–2161, doi:10.1111/febs.15871.
172. Leal, J.; Smyth, H.D.C.; Ghosh, D. Physicochemical Properties of Mucus and Their Impact on Transmucosal Drug Delivery. *Int J Pharm* **2017**, *532*, 555–572, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.09.018.
173. Porfiryeva, N.N.; Zlotver, I.; Sosnik, A. Combined Effect of Size and Charge on the Interaction of Nanoparticles with Mucus-Mimicking Mucin Hydrogels. *Pharmaceuticals* **2025**, *18*, doi:10.3390/ph18101498.
174. Gizurarson, S. The Effect of Cilia and the Mucociliary Clearance on Successful Drug Delivery. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2015**, *38*, 497–506, doi:10.1248/bpb.b14-00398.
175. Ozsoy, Y.; Gungor, S.; Cevher, E. Nasal Delivery of High Molecular Weight Drugs. *Molecules* **2009**, *14*, 3754–3779, doi:10.3390/molecules14093754.
176. Sarkar, M.A. Drug Metabolism in the Nasal Mucosa. *Pharm Res* **1992**, *9*, 1–9, doi:10.1023/A:1018911206646.
177. Jönsson, K.; Alfredsson, K.; Söderberg-Ahlm, C.; Critchley, H.; Broeders, A.; Ohlin, M. Evaluation of the Degradation of Desamino1,D-Arginine8-Vasopressin by Nasal Mucosa. *Acta Endocrinologica* **1992**, *127*, 27–32, doi:10.1530/acta.0.1270027.
178. Gizurarson, S.; Bechgaard, E. Study of Nasal Enzyme Activity towards Insulin. *In vitro*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1991**, *39*, 2155–2157, doi:10.1248/cpb.39.2155.

179. Xi, J.; Yuan, J.E.; Zhang, Y.; Nevorski, D.; Wang, Z.; Zhou, Y. Visualization and Quantification of Nasal and Olfactory Deposition in a Sectional Adult Nasal Airway Cast. *Pharm Res* **2016**, *33*, 1527–1541, doi:10.1007/s11095-016-1896-2.
180. D'Souza, A.A.; DiFrancesco, V.; Yang, A.; Bleier, B.S.; Amiji, M.M. Differential Targeting of Olfactory Epithelium and Respiratory Epithelium in Nose-to-Brain Drug Delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2026**, *23*, 17–36, doi:10.1080/17425247.2025.2568093.
181. Djupesland, P.G.; Skretting, A. Nasal Deposition and Clearance in Man: Comparison of a Bidirectional Powder Device and a Traditional Liquid Spray Pump. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* **2012**, *25*, 280–289, doi:10.1089/jamp.2011.0924.
182. Hussain, M.A.; Aungst, B.J.; Kapil, R.; Mousa, S.A. Intranasal Absorption of the Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonist, DMP 755, and the Effect of Anesthesia on Nasal Bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1997**, *86*, 1358–1360, doi:10.1021/js970208r.
183. Pires, P.C.; Rodrigues, M.; Alves, G.; Santos, A.O. Strategies to Improve Drug Strength in Nasal Preparations for Brain Delivery of Low Aqueous Solubility Drugs. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:10.3390/pharmaceutics14030588.
184. Ghadiri, M.; Young, P.M.; Traini, D. Strategies to Enhance Drug Absorption via Nasal and Pulmonary Routes. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, doi:10.3390/pharmaceutics11030113.
185. Kumar, N.N.; Lochhead, J.J.; Pizzo, M.E.; Nehra, G.; Boroumand, S.; Greene, G.; Thorne, R.G. Delivery of Immunoglobulin G Antibodies to the Rat Nervous System Following Intranasal Administration: Distribution, Dose-Response, and Mechanisms of Delivery. *Journal of Controlled Release* **2018**, *286*, 467–484, doi:10.1016/j.jconrel.2018.08.006.
186. Haasbroek-Pheiffer, A.; Van Niekerk, S.; Van der Kooy, F.; Cloete, T.; Steenekamp, J.; Hamman, J. *In vitro* and *Ex vivo* Experimental Models for Evaluation of Intranasal Systemic Drug Delivery as Well as Direct Nose-to-Brain Drug Delivery. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* **2023**, *44*, 94–112, doi:10.1002/bdd.2348.
187. Ladel, S.; Schlossbauer, P.; Flamm, J.; Luksch, H.; Mizaikoff, B.; Schindowski, K. Improved *In vitro* Model for Intranasal Mucosal Drug Delivery: Primary Olfactory and Respiratory Epithelial Cells Compared with the Permanent Nasal Cell Line RPMI 2650. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 367, doi:10.3390/pharmaceutics11080367.
188. Wengst, A.; Reichl, S. RPMI 2650 Epithelial Model and Three-Dimensional Reconstructed Human Nasal Mucosa as *in vitro* Models for Nasal Permeation Studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2010**, *74*, 290–297, doi:10.1016/j.ejpb.2009.08.008.
189. Lee, M.-K.; Yoo, J.-W.; Lin, H.; Kim, Y.-S.; Kim, D.-D.; Choi, Y.-M.; Park, S.-K.; Lee, C.-H.; Roh, H.-J. Air-Liquid Interface Culture of Serially Passaged Human Nasal Epithelial Cell Monolayer for *In vitro* Drug Transport Studies. *Drug Delivery* **2005**, *12*, 305–311, doi:10.1080/10717540500177009.

190. Ladel, S.; Maigler, F.; Flamm, J.; Schlossbauer, P.; Handl, A.; Hermann, R.; Herzog, H.; Hummel, T.; Mizaikoff, B.; Schindowski, K. Impact of Glycosylation and Species Origin on the Uptake and Permeation of IgGs through the Nasal Airway Mucosa. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1014, doi:10.3390/pharmaceutics12111014.
191. Calvillo, L. Editorial: 3Rs Approach (Replace, Reduce and Refine Animal Models) to Improve Preclinical Research. *Front Physiol* **2022**, *13*, 1040575, doi:10.3389/fphys.2022.1040575.
192. Huang, Y.; Guo, X.; Wu, Y.; Chen, X.; Feng, L.; Xie, N.; Shen, G. Nanotechnology's Frontier in Combatting Infectious and Inflammatory Diseases: Prevention and Treatment. *Sig Transduct Target Ther* **2024**, *9*, 34, doi:10.1038/s41392-024-01745-z.
193. Kurano, T.; Kanazawa, T.; Ooba, A.; Masuyama, Y.; Maruhana, N.; Yamada, M.; Iioka, S.; Ibaraki, H.; Kosuge, Y.; Kondo, H.; et al. Nose-to-Brain/Spinal Cord Delivery Kinetics of Liposomes with Different Surface Properties. *Journal of Controlled Release* **2022**, *344*, 225–234, doi:10.1016/j.jconrel.2022.03.017.
194. Migliore, M.M.; Vyas, T.K.; Campbell, R.B.; Amiji, M.M.; Waszczak, B.L. Brain Delivery of Proteins by the Intranasal Route of Administration: A Comparison of Cationic Liposomes versus Aqueous Solution Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, *99*, 1745–1761, doi:10.1002/jps.21939.
195. Pandey, S.; Shaikh, F.; Gupta, A.; Tripathi, P.; Yadav, J.S. A Recent Update: Solid Lipid Nanoparticles for Effective Drug Delivery. *Adv Pharm Bull* **2022**, *12*, 17–33, doi:10.34172/apb.2022.007.
196. Nicolas, J.; Couvreur, P. Les nanoparticules polymères pour la délivrance de principes actifs anticancéreux. *Med Sci (Paris)* **2017**, *33*, 11–17, doi:10.1051/medsci/20173301003.
197. Awad, R.; Avital, A.; Sosnik, A. Polymeric Nanocarriers for Nose-to-Brain Drug Delivery in Neurodegenerative Diseases and Neurodevelopmental Disorders. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2023**, *13*, 1866–1886, doi:10.1016/j.apsb.2022.07.003.
198. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *75*, 1–18, doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
199. Torchilin, V.P. Structure and Design of Polymeric Surfactant-Based Drug Delivery Systems. *Journal of Controlled Release* **2001**, *73*, 137–172, doi:10.1016/S0168-3659(01)00299-1.
200. Tang, Z.; He, C.; Tian, H.; Ding, J.; Hsiao, B.S.; Chu, B.; Chen, X. Polymeric Nanostructured Materials for Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science* **2016**, *60*, 86–128, doi:10.1016/j.progpolymsci.2016.05.005.
201. Nicolas, J.; Couvreur, P. Les nanoparticules polymères pour la délivrance de principes actifs anticancéreux. *Med Sci (Paris)* **2017**, *33*, 11–17, doi:10.1051/medsci/20173301003.
202. Kumar, M.; Pandey, R.S.; Patra, K.C.; Jain, S.K.; Soni, M.L.; Dangi, J.S.; Madan, J. Evaluation of Neuropeptide Loaded Trimethyl Chitosan Nanoparticles for Nose to

Brain Delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *61*, 189–195, doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.06.041.
203. Sousa, F.; Dhaliwal, H.K.; Gattacceca, F.; Sarmento, B.; Amiji, M.M. Enhanced Anti-Angiogenic Effects of Bevacizumab in Glioblastoma Treatment upon Intranasal Administration in Polymeric Nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2019**, *309*, 37–47, doi:10.1016/j.jconrel.2019.07.033.
204. Nigam, K.; Kaur, A.; Tyagi, A.; Nematullah, M.; Khan, F.; Gabrani, R.; Dang, S. Nose-to-Brain Delivery of Lamotrigine-Loaded PLGA Nanoparticles. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **2019**, *9*, 879–890, doi:10.1007/s13346-019-00622-5.
205. Bhatia, S. Chitosan Based Nanomaterials and Its Applications. In *Systems for Drug Delivery: Safety, Animal, and Microbial Polysaccharides*; Bhatia, S., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp. 55–117 ISBN 978-3-319-41926-8.
206. Riani, L.R.; Seno, G.F.B.; Silva, D.M.; Toledo, C.R.; Paiva, M.R.B.; Santos, J.S.; Fabri, R.L.; Pittella, F.; Tavares, G.D. Chitosan-Based Nanoparticles for Nose-to-Brain Drug Delivery: A Real Path toward Effective CNS Therapy? *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2026**, *12*, 2567–2589, doi:10.1021/acsbiomaterials.6c00137.
207. Wang, Y.; Li, P.; Kong, L. Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles with Versatile Surface for Improved Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech* **2013**, *14*, 585–592, doi:10.1208/s12249-013-9943-3.
208. Singh, D.; Rashid, M.; Hallan, S.S.; Mehra, N.K.; Prakash, A.; Mishra, N. Pharmacological Evaluation of Nasal Delivery of Selegiline Hydrochloride-Loaded Thiolated Chitosan Nanoparticles for the Treatment of Depression. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2016**, *44*, 865–877, doi:10.3109/21691401.2014.998824.
209. Mahar, R.; Chakraborty, A.; Nainwal, N.; Bahuguna, R.; Sajwan, M.; Jakhmola, V. Application of PLGA as a Biodegradable and Biocompatible Polymer for Pulmonary Delivery of Drugs. *AAPS PharmSciTech* **2023**, *24*, 39, doi:10.1208/s12249-023-02502-1.
210. Han, F.Y.; Thurecht, K.J.; Whittaker, A.K.; Smith, M.T. Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading. *Front Pharmacol* **2016**, *7*, 185, doi:10.3389/fphar.2016.00185.
211. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Préat, V. PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*, 505–522, doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
212. Yang, J.; Zeng, H.; Luo, Y.; Chen, Y.; Wang, M.; Wu, C.; Hu, P. Recent Applications of PLGA in Drug Delivery Systems. *Polymers (Basel)* **2024**, *16*, 2606, doi:10.3390/polym16182606.
213. Moral, M. del; Loeck, M.; Muntimadugu, E.; Vives, G.; Pham, V.; Pfeifer, P.; Battaglia, G.; Muro, S. Role of the Lactide:Glycolide Ratio in PLGA Nanoparticle Stability and Release under Lysosomal Conditions for Enzyme Replacement Therapy of Lysosomal Storage Disorders. *Journal of Functional Biomaterials* **2023**, *14*, doi:10.3390/jfb14090440.

214. Xu, Y.; Kim, C.-S.; Saylor, D.M.; Koo, D. Polymer Degradation and Drug Delivery in PLGA-Based Drug–Polymer Applications: A Review of Experiments and Theories. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2017**, *105*, 1692–1716, doi:10.1002/jbm.b.33648.
215. Hans, M.L.; Lowman, A.M. Biodegradable Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2002**, *6*, 319–327, doi:10.1016/S1359-0286(02)00117-1.
216. Vila, A.; Sánchez, A.; Tobío, M.; Calvo, P.; Alonso, M.J. Design of Biodegradable Particles for Protein Delivery. *Journal of Controlled Release* **2002**, *78*, 15–24, doi:10.1016/S0168-3659(01)00486-2.
217. da Silva, D.; Kaduri, M.; Poley, M.; Adir, O.; Krinsky, N.; Shainsky-Roitman, J.; Schroeder, A. Biocompatibility, Biodegradation and Excretion of Polylactic Acid (PLA) in Medical Implants and Theranostic Systems. *Chemical Engineering Journal* **2018**, *340*, 9–14, doi:10.1016/j.cej.2018.01.010.
218. Barillet, S.; Fattal, E.; Mura, S.; Tsapis, N.; Pallardy, M.; Hillaireau, H.; Kerdine-Römer, S. Immunotoxicity of Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles: Influence of Surface Properties on Dendritic Cell Activation. *Nanotoxicology* **2019**, *13*, 606–622, doi:10.1080/17435390.2018.1564078.
219. Varela-Fernández, R.; García-Otero, X.; Cuartero-Martínez, A.; Gómez-Lado, N.; González-Barcia, M.; Mondelo-García, C.; Aguiar, P.; Fernández-Ferreiro, A.; Otero-Espinar, F. Design and Characterization of Intravitreal Bevacizumab-Loaded PLGA Nanoparticles: Pharmacokinetic and Biodistribution Impact. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **2025**, doi:10.1007/s13346-025-01891-z.
220. Yesenia Hernández-Giottonini, K.; Josefina Rodríguez-Córdova, R.; Alejandra Gutiérrez-Valenzuela, C.; Peñuñuri-Miranda, O.; Zavala-Rivera, P.; Guerrero-Germán, P.; Lucero-Acuña, A. PLGA Nanoparticle Preparations by Emulsification and Nanoprecipitation Techniques: Effects of Formulation Parameters. *RSC Advances* **2020**, *10*, 4218–4231, doi:10.1039/C9RA10857B.
221. Bilati, U.; Allémann, E.; Doelker, E. Nanoprecipitation versus Emulsion-Based Techniques for the Encapsulation of Proteins into Biodegradable Nanoparticles and Process-Related Stability Issues. *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6*, 74, doi:10.1208/pt060474.
222. Leroux, J.-C.; Allémann, E.; De Jaeghere, F.; Doelker, E.; Gurny, R. Biodegradable Nanoparticles — From Sustained Release Formulations to Improved Site Specific Drug Delivery. *Journal of Controlled Release* **1996**, *39*, 339–350, doi:10.1016/0168-3659(95)00164-6.
223. Wang, J.; Chua, K.M.; Wang, C.-H. Stabilization and Encapsulation of Human Immunoglobulin G into Biodegradable Microspheres. *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *271*, 92–101, doi:10.1016/j.jcis.2003.08.072.
224. Vandervoort, J.; Ludwig, A. Biocompatible Stabilizers in the Preparation of PLGA Nanoparticles: A Factorial Design Study. *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, *238*, 77–92, doi:10.1016/S0378-5173(02)00058-3.

225. van de Weert, M.; Hennink, W.E.; Jiskoot, W. Protein Instability in Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microparticles. *Pharm Res* **2000**, *17*, 1159–1167, doi:10.1023/A:1026498209874.
226. Giteau, A.; Venier-Julienne, M.-C.; Marchal, S.; Courthaudon, J.-L.; Sergent, M.; Montero-Menei, C.; Verdier, J.-M.; Benoit, J.-P. Reversible Protein Precipitation to Ensure Stability during Encapsulation within PLGA Microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, *70*, 127–136, doi:10.1016/j.ejpb.2008.03.006.
227. Hariharan, S.; Bhardwaj, V.; Bala, I.; Sitterberg, J.; Bakowsky, U.; Ravi Kumar, M.N.V. Design of Estradiol Loaded PLGA Nanoparticulate Formulations: A Potential Oral Delivery System for Hormone Therapy. *Pharm Res* **2006**, *23*, 184–195, doi:10.1007/s11095-005-8418-y.
228. Xia, C.; Xiao, C. Preparation and Characterization of Dual Responsive Sodium Alginate-g-Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel. *Journal of Applied Polymer Science* **2012**, *123*, 2244–2249, doi:10.1002/app.34751.
229. Noviendri, D.; Jaswir, I.; Taher, M.; Mohamed, F.; Salleh, H.M.; Noorbatcha, I.A.; Octavianti, F.; Lestari, W.; Hendri, R.; Ahmad, H.; et al. Fabrication of Fucoxanthin-Loaded Microsphere(F-LM) By Two Steps Double-Emulsion Solvent Evaporation Method and Characterization of Fucoxanthin before and after Microencapsulation. *Journal of Oleo Science* **2016**, *65*, 641–653, doi:10.5650/jos.ess16018.
230. Lagreca, E.; Onesto, V.; Di Natale, C.; La Manna, S.; Netti, P.A.; Vecchione, R. Recent Advances in the Formulation of PLGA Microparticles for Controlled Drug Delivery. *Prog Biomater* **2020**, *9*, 153–174, doi:10.1007/s40204-020-00139-y.
231. Sahoo, S.K.; Panyam, J.; Prabha, S.; Labhasetwar, V. Residual Polyvinyl Alcohol Associated with Poly (d,l-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles Affects Their Physical Properties and Cellular Uptake. *Journal of Controlled Release* **2002**, *82*, 105–114, doi:10.1016/S0168-3659(02)00127-X.
232. Sharma, S.; Tyagi, A.; Dang, S. Nose to Brain Delivery of Transferrin Conjugated PLGA Nanoparticles for Clonidine. *International Journal of Biological Macromolecules* **2023**, *252*, 126471, doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.126471.
233. Chen, J.; Zhang, C.; Liu, Q.; Shao, X.; Feng, C.; Shen, Y.; Zhang, Q.; Jiang, X. Solanum Tuberosum Lectin-Conjugated PLGA Nanoparticles for Nose-to-Brain Delivery: *In vivo* and *in vitro* Evaluations. *Journal of Drug Targeting* **2012**, *20*, 174–184, doi:10.3109/1061186X.2011.622396.
234. Bi, C.; Wang, A.; Chu, Y.; Liu, S.; Mu, H.; Liu, W.; Wu, Z.; Sun, K.; Li, Y. Intranasal Delivery of Rotigotine to the Brain with Lactoferrin-Modified PEG-PLGA Nanoparticles for Parkinson's Disease Treatment. *International Journal of Nanomedicine* **2016**, *11*, 6547–6559, doi:10.2147/IJN.S120939.
235. Bolon, M.; Fieux, M.; Monge, C.; Richard, S. Polymeric Nanoparticles for Efficient Nose-to-Brain Delivery. *Nanoscale* **2025**, *17*, 17947–17979, doi:10.1039/D5NR00870K.
236. Mistry, A.; Stolnik, S.; Illum, L. Nose-to-Brain Delivery: Investigation of the Transport of Nanoparticles with Different Surface Characteristics and Sizes in

Excised Porcine Olfactory Epithelium. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12*, 2755–2766, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00088.
237. Mistry, A.; Glud, S.Z.; Kjems, J.; Randel, J.; Howard, K.A.; Stolnik, S.; Illum, L. Effect of Physicochemical Properties on Intranasal Nanoparticle Transit into Murine Olfactory Epithelium. *Journal of Drug Targeting* **2009**, *17*, 543–552, doi:10.1080/10611860903055470.
238. Bonaccorso, A.; Musumeci, T.; Serapide, M.F.; Pellitteri, R.; Uchegbu, I.F.; Puglisi, G. Nose to Brain Delivery in Rats: Effect of Surface Charge of Rhodamine B Labeled Nanocarriers on Brain Subregion Localization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *154*, 297–306, doi:10.1016/j.colsurfb.2017.03.035.
239. Zhao, Y.-Z.; Li, X.; Lu, C.-T.; Lin, M.; Chen, L.-J.; Xiang, Q.; Zhang, M.; Jin, R.-R.; Jiang, X.; Shen, X.-T.; et al. Gelatin Nanostructured Lipid Carriers-Mediated Intranasal Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor Enhances Functional Recovery in Hemiparkinsonian Rats. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2014**, *10*, 755–764, doi:10.1016/j.nano.2013.10.009.
240. Research, C. for D.E. and A Novel Method for Rapid Glycan Profiling of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *FDA* **2024**.
241. Current Advancements in Addressing Key Challenges of Therapeutic Antibody Design, Manufacture, and Formulation | MDPI Available online: https://www.mdpi.com/2073-4468/8/2/36 (accessed on 3 June 2026).
242. Formulation and Delivery Issues for Monoclonal Antibody Therapeutics - ScienceDirect Available online: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X06000895#bib25 (accessed on 3 June 2026).
243. Non-Invasive Delivery Strategies for Biologics | Nature Reviews Drug Discovery Available online: https://www.nature.com/articles/nrd.2018.183 (accessed on 3 June 2026).
244. Wang, W.; Singh, S.; Zeng, D.L.; King, K.; Nema, S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, *96*, 1–26, doi:10.1002/jps.20727.
245. Jacquot, G.; Lopez Navarro, P.; Grange, C.; Boudali, L.; Harlepp, S.; Pivot, X.; Detappe, A. Landscape of Subcutaneous Administration Strategies for Monoclonal Antibodies in Oncology. *Advanced Materials* **2024**, *36*, 2406604, doi:10.1002/adma.202406604.
246. Bookbinder, L.H.; Hofer, A.; Haller, M.F.; Zepeda, M.L.; Keller, G.-A.; Lim, J.E.; Edgington, T.S.; Shepard, H.M.; Patton, J.S.; Frost, G.I. A Recombinant Human Enzyme for Enhanced Interstitial Transport of Therapeutics. *Journal of Controlled Release* **2006**, *114*, 230–241, doi:10.1016/j.jconrel.2006.05.027.
247. Shire, S.J.; Shahrokh, Z.; Liu, J. Challenges in the Development of High Protein Concentration Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, *93*, 1390–1402, doi:10.1002/jps.20079.
248. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review - ScienceDirect Available online:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354919305064 (accessed on 4 June 2026).
249. Charles A Janeway, J.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M.J. The Structure of a Typical Antibody Molecule. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*; Garland Science, 2001.
250. Holliger, P.; Hudson, P.J. Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains. *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 1126–1136, doi:10.1038/nbt1142.
251. Bates, A.; Power, C.A. David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical Prospects of Antibody Fragments. *Antibodies (Basel)* **2019**, *8*, 28, doi:10.3390/antib8020028.
252. Li, Z.; Krippendorff, B.-F.; Sharma, S.; Walz, A.C.; Lavé, T.; Shah, D.K. Influence of Molecular Size on Tissue Distribution of Antibody Fragments. *mAbs* **2016**, *8*, 113–119, doi:10.1080/19420862.2015.1111497.
253. Jin, S.; Sun, Y.; Liang, X.; Gu, X.; Ning, J.; Xu, Y.; Chen, S.; Pan, L. Emerging New Therapeutic Antibody Derivatives for Cancer Treatment. *Signal Transduct Target Ther* **2022**, *7*, 39, doi:10.1038/s41392-021-00868-x.
254. Alam, M.E.; Slaney, T.R.; Wu, L.; Das, T.K.; Kar, S.; Barnett, G.V.; Leone, A.; Tessier, P.M. Unique Impacts of Methionine Oxidation, Tryptophan Oxidation, and Asparagine Deamidation on Antibody Stability and Aggregation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2020**, *109*, 656–669, doi:10.1016/j.xphs.2019.10.051.
255. Manning, M.C.; Chou, D.K.; Murphy, B.M.; Payne, R.W.; Katayama, D.S. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. *Pharm Res* **2010**, *27*, 544–575, doi:10.1007/s11095-009-0045-6.
256. Vázquez-Rey, M.; Lang, D.A. Aggregates in Monoclonal Antibody Manufacturing Processes. *Biotechnology and Bioengineering* **2011**, *108*, 1494–1508, doi:10.1002/bit.23155.
257. Spanov, B.; Aboagye, V.; Olaleye, O.; Govorukhina, N.; van de Merbel, N.C.; Bischoff, R. Effect of Trastuzumab–HER2 Complex Formation on Stress-Induced Modifications in the CDRs of Trastuzumab. *Front. Chem.* **2022**, *9*, doi:10.3389/fchem.2021.794247.
258. Zidar, M.; Šušterič, A.; Ravnik, M.; Kuzman, D. High Throughput Prediction Approach for Monoclonal Antibody Aggregation at High Concentration. *Pharm Res* **2017**, *34*, 1831–1839, doi:10.1007/s11095-017-2191-6.
259. Peng, Y.; Lyu, L.; Chen, S.; Ning, B.; Li, C.; Wu, C.-Y.; Hu, Y. Monoclonal Antibody Formulations: A Quantitative Analysis of Marketed Products and Patents. *mAbs* **2025**, *17*, 2580696, doi:10.1080/19420862.2025.2580696.
260. Moussa, E.M.; Panchal, J.P.; Moorthy, B.S.; Blum, J.S.; Joubert, M.K.; Narhi, L.O.; Topp, E.M. Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *105*, 417–430, doi:10.1016/j.xphs.2015.11.002.
261. Thwala, L.N.; Préat, V.; Csaba, N.S. Emerging Delivery Platforms for Mucosal Administration of Biopharmaceuticals: A Critical Update on Nasal, Pulmonary and Oral Routes. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2017**, *14*, 23–36, doi:10.1080/17425247.2016.1206074.

262. Bodier-Montagutelli, E.; Respaud, R.; Perret, G.; Baptista, L.; Duquenne, P.; Heuzé-Vourc'h, N.; Vecellio, L. Protein Stability during Nebulization: Mind the Collection Step! *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2020**, *152*, 23–34, doi:10.1016/j.ejpb.2020.04.006.
263. Respaud, R.; Marchand, D.; Parent, C.; Pelat, T.; Thullier, P.; Tournamille, J.-F.; Viaud-Massuard, M.-C.; Diot, P.; Si-Tahar, M.; Vecellio, L.; et al. Effect of Formulation on the Stability and Aerosol Performance of a Nebulized Antibody. *MAbs* **2014**, *6*, 1347–1355, doi:10.4161/mabs.29938.
264. Montenegro-Nicolini, M.; Morales, J.O. Overview and Future Potential of Buccal Mucoadhesive Films as Drug Delivery Systems for Biologics. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18*, 3–14, doi:10.1208/s12249-016-0525-z.
265. Aderibigbe, B.A.; Naki, T. Chitosan-Based Nanocarriers for Nose to Brain Delivery. *Applied Sciences* **2019**, *9*, doi:10.3390/app9112219.
266. Shpilberg, O.; Jackisch, C. Subcutaneous Administration of Rituximab (MabThera) and Trastuzumab (Herceptin) Using Hyaluronidase. *Br J Cancer* **2013**, *109*, 1556–1561, doi:10.1038/bjc.2013.371.
267. Covell, D.G.; Barbet, J.; Holton, O.D.; Black, C.D.V.; Parker, R.J.; Weinstein, J.N. Pharmacokinetics of Monoclonal Immunoglobulin G1, F(Ab')2, and Fab' in Mice. *Cancer Res* **1986**, *46*, 3969–3978.
268. Liu, L. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *protein. cell.* **2018**, *9*, 15–32, doi:10.1007/s13238-017-0408-4.
269. Jevševar, S.; Kunstelj, M.; Porekar, V.G. PEGylation of Therapeutic Proteins. *Biotechnology Journal* **2010**, *5*, 113–128, doi:10.1002/biot.200900218.
270. Chapman, A.P. PEGylated Antibodies and Antibody Fragments for Improved Therapy: A Review. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 531–545, doi:10.1016/S0169-409X(02)00026-1.
271. Sah, H. Protein Instability toward Organic Solvent/Water Emulsification: Implications for Protein Microencapsulation into Microspheres. *PDA J Pharm Sci Technol* **1999**, *53*, 3–10.
272. Pabari, R.M.; Ryan, B.; McCarthy, C.; Ramtoola, Z. Effect of Microencapsulation Shear Stress on the Structural Integrity and Biological Activity of a Model Monoclonal Antibody, Trastuzumab. *Pharmaceutics* **2011**, *3*, 510–524, doi:10.3390/pharmaceutics3030510.
273. Mechanically-Induced Aggregation of the Monoclonal Antibody Cetuximab - ScienceDirect Available online: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000345090900090X (accessed on 4 June 2026).
274. Lipid-Based Surface Engineering of PLGA Nanoparticles for Drug and Gene Delivery Applications. *Biomaterials Research*.
275. Cartiera, M.S.; Johnson, K.M.; Rajendran, V.; Caplan, M.J.; Saltzman, W.M. The Uptake and Intracellular Fate of PLGA Nanoparticles in Epithelial Cells. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2790–2798, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.01.057.

276. Marecki, E.K.; Oh, K.W.; Knight, P.R.; Davidson, B.A. Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticle Fabrication, Functionalization, and Biological Considerations for Drug Delivery. *Biomicrofluidics* **2024**, *18*, 051503, doi:10.1063/5.0201465.
277. Ismail, R.; Sovány, T.; Gácsi, A.; Ambrus, R.; Katona, G.; Imre, N.; Csóka, I. Synthesis and Statistical Optimization of Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles Encapsulating GLP1 Analog Designed for Oral Delivery. *Pharm Res* **2019**, *36*, 99, doi:10.1007/s11095-019-2620-9.
278. Joshi, S.; Maharana, C.; Rathore, A.S. An Application of Nano Differential Scanning Fluorimetry for Higher Order Structure Assessment between mAb Originator and Biosimilars: Trastuzumab and Rituximab as Case Studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2020**, *186*, 113270, doi:10.1016/j.jpba.2020.113270.
279. Schober, G.B.; Story, S.; Arya, D.P. A Careful Look at Lipid Nanoparticle Characterization: Analysis of Benchmark Formulations for Encapsulation of RNA Cargo Size Gradient. *Sci Rep* **2024**, *14*, 2403, doi:10.1038/s41598-024-52685-1.
280. Ren, L.; Zhao, Z.; Chao, Y.; Yu, P.; Mei, Z.; Du, B.; Cheng, Y. Optimization of Lipid Nanoparticles with Robust Efficiency for the Delivery of Protein Therapeutics to Augment Cancer Immunotherapy. *Adv Sci (Weinh)* **2025**, *12*, e2500844, doi:10.1002/advs.202500844.
281. Ugˇurlu, N.; Aşık, M.D.; Çakmak, H.B.; Tuncer, S.; Turk, M.; Çagˇıl, N.; Denkbas, E.B. Transscleral Delivery of Bevacizumab-Loaded Chitosan Nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol* **2019**, *15*, 830–838, doi:10.1166/jbn.2019.2716.
282. Pandit, J.; Sultana, Y.; Aqil, M. Chitosan-Coated PLGA Nanoparticles of Bevacizumab as Novel Drug Delivery to Target Retina: Optimization, Characterization, and *in vitro* Toxicity Evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2017**, *45*, 1397–1407, doi:10.1080/21691401.2016.1243545.
283. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) ICH Q3C (R9) Residual Solvents - Scientific Guideline | European Medicines Agency (EMA) Available online: https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3c-r9-residual-solvents-scientific-guideline (accessed on 18 July 2026).
284. Kannan, A.; Shieh, I.C.; Fuller, G.G. Linking Aggregation and Interfacial Properties in Monoclonal Antibody-Surfactant Formulations. *Journal of Colloid and Interface Science* **2019**, *550*, 128–138, doi:10.1016/j.jcis.2019.04.060.
285. Budhian, A.; Siegel, S.J.; Winey, K.I. Production of Haloperidol-Loaded PLGA Nanoparticles for Extended Controlled Drug Release of Haloperidol. *Journal of Microencapsulation* **2005**, *22*, 773–785, doi:10.1080/02652040500273753.
286. Derman, S. Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded PLGA Nanoparticles: Effect of Various Process Parameters on Reaction Yield, Encapsulation Efficiency, and Particle Size. *Journal of Nanomaterials* **2015**, *2015*, 341848, doi:10.1155/2015/341848.
287. Bilati, U.; Allémann, E.; Doelker, E. Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Protein-Loaded Nanoparticles Prepared by the Double Emulsion Method—Processing and

Formulation Issues for Enhanced Entrapment Efficiency. *Journal of Microencapsulation* **2005**, *22*, 205–214, doi:10.1080/02652040400026442.
288. Castillo-Santaella, T. del; Ortega-Oller, I.; Padial-Molina, M.; O'Valle, F.; Galindo-Moreno, P.; Jódar-Reyes, A.B.; Peula-García, J.M. Formulation, Colloidal Characterization, and *In vitro* Biological Effect of BMP-2 Loaded PLGA Nanoparticles for Bone Regeneration. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, doi:10.3390/pharmaceutics11080388.
289. Fredenberg, S.; Wahlgren, M.; Reslow, M.; Axelsson, A. The Mechanisms of Drug Release in Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)-Based Drug Delivery Systems—A Review. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *415*, 34–52, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.049.
290. Ensign, L.M.; Schneider, C.; Suk, J.S.; Cone, R.; Hanes, J. Mucus Penetrating Nanoparticles: Biophysical Tool and Method of Drug and Gene Delivery. *Advanced Materials* **2012**, *24*, 3887–3894, doi:10.1002/adma.201201800.
291. Adebileje, T.; Amani, A. Modelling Particle Size, Drug Loading and Release of BSA Encapsulated into PLGA Nanoparticles. *Journal of Material Science & Engineering* **2019**, *07*, doi:10.4172/2169-0022.1000496.
292. Yan, F.; Zhang, C.; Zheng, Y.; Mei, L.; Tang, L.; Song, C.; Sun, H.; Huang, L. The Effect of Poloxamer 188 on Nanoparticle Morphology, Size, Cancer Cell Uptake, and Cytotoxicity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, *6*, 170–178, doi:10.1016/j.nano.2009.05.004.
293. Jain, D.; Athawale, R.; Bajaj, A.; Shrikhande, S.; Goel, P.N.; Gude, R.P. Studies on Stabilization Mechanism and Stealth Effect of Poloxamer 188 onto PLGA Nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *109*, 59–67, doi:10.1016/j.colsurfb.2013.03.027.
294. Hartl, N.; Adams, F.; Merkel, O.M. From Adsorption to Covalent Bonding: Apolipoprotein E Functionalization of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery Across the Blood–Brain Barrier. *Advanced Therapeutics* **2021**, *4*, 2000092, doi:10.1002/adtp.202000092.
295. Recent Progress in Pharmaceutical Excipients as P-Glycoprotein Inhibitors for Potential Improvement of Oral Drug Bioavailability: A Comprehensive Overview. *PHARMACIA* **2025**, *72*, 1–16, doi:10.3897/pharmacia.72.e140734.
296. Liu, G.; McEnnis, K. Glass Transition Temperature of PLGA Particles and the Influence on Drug Delivery Applications. *Polymers* **2022**, *14*, doi:10.3390/polym14050993.
297. Madani, F.; Goodarzi, A.; Hashemi, M.; Mujokoro, B.; Khosravani, M.; Adabi, M. Preparation of Methotrexate Loaded PLGA Nanoparticles Coated with PVA and Poloxamer188. *Nanomedicine Research Journal* **2018**, *3*, 19–24, doi:10.22034/nmrj.2018.01.003.
298. Varela-Fernández, R.; García-Otero, X.; Cuartero-Martínez, A.; Gómez-Lado, N.; González-Barcia, M.; Mondelo-García, C.; Aguiar, P.; Fernández-Ferreiro, A.; Otero-Espinar, F. Design and Characterization of Intravitreal Bevacizumab-Loaded PLGA

Nanoparticles: Pharmacokinetic and Biodistribution Impact. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **2026**, *16*, 1262–1284, doi:10.1007/s13346-025-01891-z.
299. Sahoo, S.K.; Panyam, J.; Prabha, S.; Labhasetwar, V. Residual Polyvinyl Alcohol Associated with Poly (d,l-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles Affects Their Physical Properties and Cellular Uptake. *Journal of Controlled Release* **2002**, *82*, 105–114, doi:10.1016/S0168-3659(02)00127-X.
300. Liu, G.; Martinez, R.; Bhatnagar, A.; McEnnis, K. Influence of Surfactant on Glass Transition Temperature of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles. *Soft Matter* **2023**, *19*, 5371–5378, doi:10.1039/d3sm00082f.
301. Geddie, M.L.; Kirpotin, D.B.; Kohli, N.; Kornaga, T.; Boll, B.; Razlog, M.; Drummond, D.C.; Lugovskoy, A.A. Development of Disulfide-Stabilized Fabs for Targeting of Antibody-Directed Nanotherapeutics. *mAbs* **2022**, *14*, 2083466, doi:10.1080/19420862.2022.2083466.
302. Jain, D.; Athawale, R.; Bajaj, A.; Shrikhande, S.; Goel, P.N.; Gude, R.P. Studies on Stabilization Mechanism and Stealth Effect of Poloxamer 188 onto PLGA Nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *109*, 59–67, doi:10.1016/j.colsurfb.2013.03.027.
303. Madani, F.; Goodarzi, A.; Hashemi, M.; Mujokoro, B.; Khosravani, M.; Adabi, M. Preparation of Methotrexate Loaded PLGA Nanoparticles Coated with PVA and Poloxamer188. *Nanomedicine Research Journal* **2018**, *3*, 19–24, doi:10.22034/nmrj.2018.01.003.
304. Hartl, N.; Adams, F.; Merkel, O.M. From Adsorption to Covalent Bonding: Apolipoprotein E Functionalization of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery Across the Blood–Brain Barrier. *Advanced Therapeutics* **2021**, *4*, 2000092, doi:10.1002/adtp.202000092.
305. Song, C.K.; Balakrishnan, P.; Shim, C.-K.; Chung, S.-J.; Kim, D.-D. Enhanced *in vitro* Cellular Uptake of P-Gp Substrate by Poloxamer-Modified Liposomes (PMLs) in MDR Cancer Cells. *Journal of Microencapsulation* **2011**, *28*, 575–581, doi:10.3109/02652048.2011.599436.
306. 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.
307. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Préat, V. PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*, 505–522, doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
308. Freiberg, S.; Zhu, X.X. Polymer Microspheres for Controlled Drug Release. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *282*, 1–18, doi:10.1016/j.ijpharm.2004.04.013.
309. Illum, L. Nasal Drug Delivery—Possibilities, Problems and Solutions. *Journal of Controlled Release* **2003**, *87*, 187–198, doi:10.1016/S0168-3659(02)00363-2.
310. Djupesland, P.G. Nasal Drug Delivery Devices: Characteristics and Performance in a Clinical Perspective-a Review. *Drug Deliv Transl Res* **2013**, *3*, 42–62, doi:10.1007/s13346-012-0108-9.

311. Ilium, L. Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient. *Pharm Res* **1998**, *15*, 1326–1331, doi:10.1023/A:1011929016601.
312. Bernkop-Schnürch, A.; Dünnhaupt, S. Chitosan-Based Drug Delivery Systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2012**, *81*, 463–469, doi:10.1016/j.ejpb.2012.04.007.
313. Ratio of Trastuzumab Levels in Serum and... : Anti-Cancer Drugs Available online: https://www.ovid.com/jnls/anti-cancerdrugs/fulltext/10.1097/01.cad.0000236313.50833.ee~ratio-of-trastuzumab-levels-in-serum-and-cerebrospinal-fluid (accessed on 12 July 2026).
314. Park, Y.H.; Park, M.J.; Ji, S.H.; Yi, S.Y.; Lim, D.H.; Nam, D.H.; Lee, J.-I.; Park, W.; Choi, D.H.; Huh, S.J.; et al. Trastuzumab Treatment Improves Brain Metastasis Outcomes through Control and Durable Prolongation of Systemic Extracranial Disease in HER2-Overexpressing Breast Cancer Patients. *Br J Cancer* **2009**, *100*, 894–900, doi:10.1038/sj.bjc.6604941.
315. Le Tilly, O.; Azzopardi, N.; Bonneau, C.; Desvignes, C.; Oberkampf, F.; Ezzalfani, M.; Ternant, D.; Turbiez, I.; Gutierrez, M.; Paintaud, G. Antigen Mass May Influence Trastuzumab Concentrations in Cerebrospinal Fluid After Intrathecal Administration. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2021**, *110*, 210–219, doi:10.1002/cpt.2188.
316. Schellhammer, L.; Beffinger, M.; Salazar, U.; Laman, J.D.; Buch, T.; vom Berg, J. Exit Pathways of Therapeutic Antibodies from the Brain and Retention Strategies. *iScience* **2023**, *26*, 108132, doi:10.1016/j.isci.2023.108132.
317. Fadera, S.; Boas, C.A.W.V.; Yue, Y.; Gu, Z.; Yuan, J.; De, D.; Rogers, B.E.; Nazeri, A.; Chen, H. Focused Ultrasound-Enhanced Nose-to-Brain Delivery of a Therapeutic Antibody in a Large-Animal Model. *Theranostics* **2026**, *16*, 2156–2169, doi:10.7150/thno.124354.
318. Di Francesco, V.; Chua, A.J.; Bleier, B.S.; Amiji, M.M. Effective Nose-to-Brain Delivery of Blood-Brain Barrier Impermeant Anti-IL-1β Antibody via the Minimally Invasive Nasal Depot (MIND) Technique. *ACS Appl Mater Interfaces* **2024**, *16*, 69103–69113, doi:10.1021/acsami.4c18679.
319. Soleimanizadeh, A.; Dinter, H.; Schindowski, K. Central Nervous System Delivery of Antibodies and Their Single-Domain Antibodies and Variable Fragment Derivatives with Focus on Intranasal Nose to Brain Administration. *Antibodies (Basel)* **2021**, *10*, 47, doi:10.3390/antib10040047.
320. Nigam, K.; Kaur, A.; Tyagi, A.; Nematullah, M.; Khan, F.; Gabrani, R.; Dang, S. Nose-to-Brain Delivery of Lamotrigine-Loaded PLGA Nanoparticles. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **2019**, *9*, 879–890, doi:10.1007/s13346-019-00622-5.
321. Lai, S.K.; Wang, Y.-Y.; Wirtz, D.; Hanes, J. Micro- and Macrorheology of Mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, *61*, 86–100, doi:10.1016/j.addr.2008.09.012.
322. Kumar, S.; Yadav, A.; Verma, R.K.; Kumar, A.; Gupta, P.K.; Shukla, R. Intranasal Therapeutics for Neurodegenerative Disorders: Overcoming the Blood–Brain Barrier with Smart Formulations and Devices. *Mol. Pharmaceutics* **2025**, *22*, 3602–3620, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5c00386.

323. Suk, J.S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L.M. PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *99*, 28–51, doi:10.1016/j.addr.2015.09.012.
324. Trevino, J.; Quispe, R.; Khan, F.; Novak, V. Non-Invasive Strategies for Nose-to-Brain Drug Delivery. *J Clin Trials* **2020**, *10*, 439.

# ANNEXES

*pharmaceutics*

MDPI

*Article*

# In Vitro Evaluation of the Efficient Passage of PLGA-Formulated Trastuzumab for Nose-to-Brain Delivery

**Léa Kengne Kamkui [1], Clémence Disdier [1,2,†], Amaury Herbet [1,†], Narciso Costa [1], Anne-Cécile Guyot [1], Didier Boquet [1,*] and Aloïse Mabondzo [1]**

[1] Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Laboratoire d'Etude de l'Unité Neurovasculaire et Innovation Thérapeutique (LENIT), 91191 Gif-sur-Yvette, France; lea.kengnekamkui@cea.fr (L.K.K.); clemence.disdier@cea.fr (C.D.); amaury.herbet@cea.fr (A.H.); narciso.costa@cea.fr (N.C.); anne-cecile.guyot@cea.fr (A.-C.G.); aloise.mabondzo@cea.fr (A.M.)

[2] CERES-BRAIN Therapeutics, Institut du Cerveau ICM, Hôpital Pitié Salpêtrière, 47 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France

* Correspondence: didier.boquet@cea.fr

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract: Background/Objectives**: The limited permeability of the blood–brain barrier (BBB) to biotherapeutics is a major challenge in the treatment of brain tumors. The nose-to-brain (N2B) delivery approach, which bypasses the BBB, offers a promising alternative way to treat these tumors. The aim of this work was to develop PLGA nanoparticles for N2B delivery of biodrugs using trastuzumab (TZB) as a paradigm. **Methods**: An in vitro model was used to evaluate the ability of PLGA nanoparticles to enhance passage through the nasal epithelium. We also compared the passage of loaded TZB versus unencapsulated TZB across an in vitro BBB model simulating systemic administration of TZB. TZB-loaded PLGA nanoparticles (NP-TZBs) were prepared using a double emulsion method followed by solvent evaporation and characterized for various properties, including particle size, polydispersity index, zeta potential, morphology, encapsulation efficiency, and drug loading capacity and release kinetics. TZB functionality was assessed after release from NP or passage through an in vitro barrier model. The permeability of TZB and NP-TZBs through in vitro models of nasal epithelium and BBB was investigated. **Results**: NP-TZBs exhibited an average size of about 200 nm with a polydispersity index of less than 20%, neutral charge, and a loading efficiency of 67%. Transmission electron microscopy revealed spherical nanoparticles with a smooth surface. Importantly, the TZB released from the nanoparticles retained all of its physicochemical properties and functionality. We observed that the NP-TZB formulation results in at least a nine-fold increase in TZB permeability across the nasal epithelium 24 h post-exposure, depending on the exposure conditions, but shows no significant improvement across the BBB model. The TZB released in the basal compartment is fully functional and able to recognize HER2 expressed on the surface of breast tumor BT474 cells. **Conclusions**: Using compounds already validated for clinical use, we were able to develop a formulation that allowed efficient passage of TZB across an in vitro nasal epithelial model. In contrast, no passage was observed across the BBB, supporting the notion of the superiority of the nose–brain route over systemic injection for in vivo delivery of TZB to the central nervous system.

**Keywords:** PLGA nanoparticles; trastuzumab; nose-to-brain formulation; nasal epithelium model; blood–brain barrier

check for updates

Academic Editor: Daisuke Inoue

Received: 31 March 2025
Revised: 15 May 2025
Accepted: 16 May 2025
Published: 22 May 2025

**Citation:** Kengne Kamkui, L.; Disdier, C.; Herbet, A.; Costa, N.; Guyot, A.-C.; Boquet, D.; Mabondzo, A. In Vitro Evaluation of the Efficient Passage of PLGA-Formulated Trastuzumab for Nose-to-Brain Delivery. *Pharmaceutics* **2025**, *17*, 681. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17060681

**Copyright:** © 2025 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/).

## 1. Introduction

Lung, breast, and melanoma cancer are the most likely primary cancers to give rise to brain metastases (BMs) [1] and are associated with a poor outlook, with patients typically surviving 10 to 15 months on average [2]. Local therapies such as surgery, whole-brain radiotherapy, and stereotactic radiotherapy are the most common interventions employed in clinical practice [3,4] and are often associated with a range of side effects, including cognitive impairment [5]. Systemic treatment with therapeutic antibodies has emerged as an alternative therapeutic option.

TZB, an HER2 receptor-blocking antibody, has significantly improved survival outcomes for patients with HER2-positive breast cancer [6]. However, the incidence of BMs even under TZB treatment is on the rise and is associated with a poor overall prognosis [7]. This lack of efficacy of systemic injected TZB may be related to poor distribution of the drug to the central nervous system due to the blood–brain barrier (BBB), which tightly regulates the exchange between the blood and the brain [8]. Several observations indicate that the BBB is more permeable in metastatic brain tumors, forming the "blood-tumor barrier" [9–11] as evidenced by clinical trials investigating antibody–drug conjugates for the treatment of BMs. For instance, the phase 2 trials DESTINY-BREST 01 (NCT03248492) and TUXEDO-1 (NCT04752059) demonstrated improved intracranial responses in patients treated with TZB conjugated to a cytotoxic agent (trastuzumab-deruxtecan) [12,13]. However, the ability of TZB to reach and target tumor cells in the brain remains unpredictable due to the fact that permeability is heterogeneous and also depends on the tumor's stage of development [10]. As a result, therapeutic options for treating BMs are limited, and enhancing the ability of therapeutic antibodies to reach and accumulate in the brain is a major research area.

To address this major challenge, we chose to deliver TZB via the nose-to-brain (N2B) pathway. Nasal delivery provides an alternative route for transporting therapeutic agents to the brain, bypassing the BBB by the direct connection of the nose and brain via olfactory and trigeminal nerves. This approach offers several advantages, including ease of administration, improved patient compliance, rapid drug action, and reduced systemic side effects [14]. However, nasal administration presents certain challenges, including a smaller surface area, mucociliary clearance, and the presence of enzymes at the administration site [14–16]. To overcome these barriers and optimize brain bioavailability, appropriate formulations are required [16]. Nanocarriers can improve brain bioavailability through several mechanisms, such as increasing drug residence time in the nasal cavity, promoting drug diffusion across the mucosa and into cells, optimizing drug properties for nasal absorption, and improving drug solubility. Furthermore, nanocarriers may also control drug release and minimize systemic side effects by reducing drug distribution in non-targeted areas [17]. In this study, we combined the benefits of nasal administration with a nanoparticulate formulation to improve the brain distribution of TZB. We developed and characterized PLGA nanoparticles (NPs) loaded with TZB (NP-TZBs) and the ability of the NP-TZB formulation to increase its passage through the nasal epithelium was evaluated using an in vitro model. Since the nasal cavity is highly vascularized, a significant fraction of the drug can be absorbed and distributed through systemic circulation. Although circulating antibodies cross the BBB to a very limited extent, nanocarriers may enhance their permeability. Therefore, we also assessed the capacity of our NP-TZBs to increase their passage through a BBB model in vitro.

## 2. Materials and Methods

### *2.1. Trastuzumab Production*

Trastuzumab was subcloned in a eukaryotic expression vector (pZyvec A1879, PolyPlus, Illkirch, France), produced according to a supplier's standard protocol by ExpiCHO™ cells (ThermoFisher Scientific Carlsbad, CA, USA) and purified with a Protein A resin HiTrap Protein A HP column (GE Healthcare-17-0402-03) on an AKTA Purifier system (GE Healthcare, Solingen, Germany). TZB was eluted with 50 mM sodium citric acid buffer pH 4.0, fractions were neutralized with 1 M Tris HCl buffer pH 9 and then pooled, and TZB was dialyzed in MWCO 20 kDa dialysis cassettes in PBS buffer. The TZB produced was characterized by SDS-PAGE and dynamic light scattering (DLS) and the concentration was determined at 280 nm using a Spectramax M5 Spectrophotometer equipped with SoftMaxPro 5.4.1 software (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, USA) by applying the molar extinction coefficient of 210,000 $M^{-1}cm^{-1}$). The thermal denaturation profile of TZB was determined using the Tycho NT.6 instrument (NanoTemper, München, Germany), which generated thermal unfolding curves and identified the inflection temperature (Ti) as an indicator of changes in protein structural integrity.

### *2.2. Preparation and Characterization of Trastuzumab-Loaded PLGA NPs*

#### 2.2.1. Nanoparticle Preparation

Trastuzumab NPs (NP-TZBs) were prepared by the optimized W1/O/W2 double emulsion method followed by solvent evaporation [18]. First, a volume of internal aqueous phase containing 1 mg of TZB and 2.5% poloxamer P188 (Kolliphor Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, USA) was finely dispersed in a volume (to achieve a 3:2 volumetric ratio of organic to aqueous phase of organic solution) of ethyl acetate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) at 100 mg/mL PLGA (poly D,L-lactic-co-glycolic acid, Resomer® RG 504 H LA/GA ratio 50:50, average molecular weights MW 38–54 kDa Darmstadt, Germany) using a Vibra-Cell™ ultrasonic homogenizer (Sonics®, Newtown, CT, USA) with 40% amplitude for 30 s. Next, the primary emulsion (W1/O) obtained was dispersed in aqueous 2% polyvinyl alcohol (PVA) (MW 30–70 kDa) (to achieve a 2:1 volumetric ratio of PVA solution to W1/O) solution (surfactant) and homogenized for 1 min using the same sonication conditions. Finally, the second emulsion (W/O/W) was diluted with 10 mL of the same surfactant solution under magnetic stirring. The resulting suspension was kept under magnetic stirring at moderate speed in a fume hood for 4 h to remove ethyl acetate. The NPs were washed by repeating three times the centrifugation procedure at 20,000× *g* for 30 min and resuspending in ultrapure water. Finally, the product was dried by freeze-drying (FreeZone Triad, Labconco., Kansas City, MO, USA) and stored at 4 °C. The same procedure was used to produce TZB-unloaded NPs.

#### 2.2.2. Size Measurement and Zeta Potential Morphology

The hydrodynamic radius and polydispersity index of the formulations were determined by DLS using the Dynapro Nanostar instrument (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA). Zeta potential was determined by electrophoretic mobility using the Wallis Zeta Potential instrument (Cordouan-Technologies, Pessac, France). Measurements were carried out in triplicate after appropriate suspension in PBS and dilution in Milli-Q water at 25 °C of either freshly formulated NPs or lyophilisates. The shape of the NPs was observed by transmission electron microscopy. Samples were fixed in a grid, treated with uranyl acetate, and then observed in a JEOL JEM-1400 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

#### 2.2.3. Trastuzumab Encapsulation Efficacy (EE%) and Drug Loading Capacity (DL%)

The EE% and DL% of NPs were assessed by indirect and direct methods, respectively. First, the freshly prepared NP suspension was centrifuged for 50 min at 20,000 RCF. The amount of TZB in the supernatant was assessed using the bicinchoninic acid assay (10678484; ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's protocol. EE% was calculated as the difference between the initial amounts of TZB introduced in the formulation and the free amount detected in the supernatant using the following equation:

$$\text{EE\%} = (\text{Initial amount of TZB} - \text{Free TZB in supernantant})/(\text{Initial amount of TZB}) \times 100 \quad (1)$$

To determine the DL%, a suspension of 10 mg/mL of NP-TZBs was prepared in 0.1 M NaOH, 2% SDS solution under continuous stirring for 1 h at 37 °C to hydrolyze the PLGA. The solution was neutralized with 1 M HCl solution, centrifuged for 30 min at 20,000 RCF, and the supernatant was analyzed with the bicinchoninic acid assay to determine the content of released TZB. Drug loading capacity was determined using the following formula:

$$\text{DL\%} = (\text{Total amount of TZB after hydrolysis})/(\text{ dry weight of NPs}) \times 100 \quad (2)$$

#### 2.2.4. Study of TZB Release Kinetics from NPs in PBS Buffer, Nasal Mucus, or Plasma

A total of 1 mL of a 10 mg/mL suspension of NPs in PBS pH 7.4, artificial nasal mucus (BZ253; Biochemazone, Leduc, AB, Canada), or rat plasma was prepared from the NP lyophilisate and incubated at 37 °C with constant stirring (1000 rpm) for 232 h. At predefined time points, the suspension was centrifuged at 20,000 RCF for 20 min at room temperature to separate NP pellets from supernatants. A total of 100 µL of supernatant was sampled and replaced with the same volume of fresh PBS or plasma. The NP pellet was resuspended and incubated again. Supernatant samples were frozen until further analysis to determine the TZB concentration using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

### *2.3. ELISA Assay*

High-binding 96-well plates (439454; ThermoFisher Scientific™ MaxiSorp™, Roskilde, Denmark) were coated with 5 µg/mL IgG (150 µL/well) polyclonal goat anti-human Kappa-UNLB (206001; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) in 0.05 M phosphate buffer pH 7.4 overnight at room temperature. The plates were then emptied, and the wells were filled with 300 µL of saturation buffer (0.1 M phosphate buffer pH 7.4, 0.1% BSA, 0.15 M NaCl, $1 \times 10^{-3}$ M EDTA) and incubated for 24 h at 4 °C. Plates were washed three times with wash buffer (1 M PBS with 0.05% Tween 20). Samples diluted in assay buffer were added to wells and incubated overnight at 4 °C. Plates were washed three times as described above. Mouse monoclonal anti-human IgG1 (Fc-region)-HRP conjugate detection antibody conjugated to horseradish peroxidase (9230-05; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) was diluted 1:50,000 in assay buffer, added to the wells (100 µL/well), and incubated for 4 h at room temperature. After three washes with wash buffer, the chromogenic substrate TMB ONE (4380A; Kementec, Kuldyssen, Taastrup, Danemark) was used for detection, incubated for 30 min, and the reaction was stopped by adding 1 M HCl solution (50 µL/well). Finally, the absorbance of the plates was read at 450 nm using the SpectraMax™ spectrophotometer.

### *2.4. Flow Cytometry*

BT474 cells over-expressing human epidermal growth factor receptor 2, HER2 (HTB-20 TM 70029709, ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in Hybri-Care Medium (46-X;

ATCC, Manassas, VA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (DE14-801E; Lonza, Basel, Switzerland), following the supplier's recommended culture procedure. To determine the apparent dissociation constant (Kd), binding experiments were performed. For flow cytometry analysis (FACS), BT474 cells were harvested at 85% confluence using a versene solution (PBS—0.05% EDTA), washed once in PBS, suspended in a saturation buffer (0.5% BSA, 5% normal goat serum NGS, D-PBS) at a concentration of $3 \times 10^5$ cells/mL, and incubated overnight at 4 °C with different concentrations of antibodies (0.005 to 125 nM) at a final concentration of $1.5 \times 10^5$ cells / tube. Cells were washed three times in cold PBS and suspended with 300 µL of saturation buffer containing the secondary antibody anti-human Alexa Fluor™ 488 (AF488) (H10120; Invitrogen, Frederick, MD, USA) and incubated for 4 h at 4 °C. Then, after three washes in PBS, the fluorescence intensity of 10,000 cells was quantified with a FACS Calibur (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). The mean fluorescence intensity (MFI) was generated, and the data were analyzed using GraphPad Prism 9.4 software (GraphPad Software San Diego, CA, USA).

### *2.5. Study of TZB Passage Using In Vitro Models*

#### 2.5.1. Epithelium Nasal Barrier Model Air-Liquid Interface

The RPMI 2650 cells (ECACC, Sigma-Aldrich, Salisbury, UK) were cultured in a 25 $cm^2$ polystyrene cell-culture flask under standard conditions in an incubator at 37 °C and 5% $v/v$ of $CO_2$. The culture medium (MEM with phenol red, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% Pen/Strep solution, 1% L-glutamine, and 1% NEAA, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Germany) was changed every couple of days. Our experimental approach was inspired by and adapted from previously published work (Figure S1) [19–23]. The cells were trypsinized when confluence reached about 80% and then seeded on permeable Thincert® (Greiner bio-one Neumarkt St. Gallen, Switzerland, 12 wells PET 1 µm) at a density of $5 \times 10^5$ cells/$cm^2$. The cells were cultured in a liquid-covered culture for 48 h. The insert was then lifted to the air–liquid interface (ALI) and cultured for 15 more days with culture medium changed every 2 or 3 days. A time-course assessment of the multilayer characteristics was conducted in terms of permeability by measuring transepithelial electrical resistance (TEER), lucifer yellow permeability, and mucus production over time (Figure S2). TEER values were recorded on days 5, 7, 12, and 14 using an epithelial Volt/Ohm meter EVOM2® (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) (Figure S2a). For TEER evaluations, 0.5 mL of fresh insert culture medium was added to the apical side. Cells were incubated for approximately 15 min before measurements. A TEER value above 75 Ω/$cm^2$ was required to initiate the permeability study. Mucus secretion on the surface of the RPMI 2650 cell multilayer was visualized using Alcian blue staining (ThermoFisher Scientific, Ward Hill, MA, USA) dye [21]. Images were acquired with a microscope (Olympus CKX41, Tokyo, Japan) equipped with a camera (Megapixel FireWire PixeLINK™ Ottawa, ON, K1G 6C2, Canada). Mucin production is depicted in Figure S2c,e. Overall, validation of the multilayer model RPMI 2650 cells demonstrated a time-dependent increase in TEER, a progressive decrease in lucifer yellow permeability until day 15, and a gradual increase in mucus production under ALI conditions, with a homogeneous distribution across the insert surface around day 15 (Figure S2c). These results allowed us to conduct our permeability study between days 14 and 15, following characterization of barrier integrity through lucifer yellow permeability assessment and TEER monitoring.

#### 2.5.2. BBB In Vitro Cell-Based Model

Our group has previously developed and optimized a well-defined and validated in vitro BBB model. Rat primary brain endothelial cells and glial cells were isolated and cultured as previously described [24]. Briefly, for isolation of brain endothelial cells, brain

tissue was subjected to enzymatic digestion with a solution containing 1 g/L collagenase/dispase (10269638001; Roche, Basel, Switzerland), 20 U/mL DNase I (04536282001; Roche, Basel, Switzerland), and 0.147 mg/L of protease inhibitor N-α-tosyl-L-lysinyl-chloromethylketone (90182; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in HBSS buffer (14170-088; Gibco, Grand Island, NY, USA), incubated for 1 h at 37 °C. Capillaries were isolated using a 20% BSA gradient. After a second round of enzymatic digestion, the cells were plated in 75 $cm^2$ coated culture flasks and cultured in EBM medium supplemented with the EGM-2 MV Single Quots kit (Lonza, Basel, Switzerland). The cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% $CO_2$ for 5–6 days before being trypsinized and frozen. Glial cells were first seeded on Transwell plates at a density of 5700 cells/$cm^2$ in their specific medium. Brain endothelial cells were seeded on the Transwell insert membrane (pore size 0.4 mm, Costar, Dutscher sa, Brumath, France) at a density of 71,400 cells/$cm^2$ using their specific media. To allow barrier formation, the plates were incubated for 8–10 days. During this time, barrier characteristics were monitored and validated as previously described [24]. For permeability experiments, F-TZB and NP-TZB formulations were diluted in the endothelial cell medium in the apical pole of the model for 1 or 2 h to mimic blood exposure.

#### 2.5.3. In Vitro Permeability Experimental Procedures

For the permeability experiments, 100 µL of various concentrations of NP-TZBs and free-TZB (F-TZB) in PBS was applied at the apical compartment for 60 min under standard incubation conditions (Figure S1). Samples from the basal compartment were collected from each group at 1, 5, and 24 h. The samples taken at the 1 and 5 h time points were replaced with an equal volume of pre-warmed fresh medium. To determine the TZB concentration inside the nasal epithelium, the cell layer from the insert was carefully removed, and the cells were disrupted in a lysis buffer composed of 0.5% Triton X-100, 1 M PBS, and protease inhibitor Cocktail® (4693132001 Roche, Mannheim, Germany). The lysates were then centrifuged at 13,200 RPM for 20 min at 4 °C to pellet the cellular debris. The supernatants were aliquoted for subsequent ELISA assays. The supernatants were also analyzed by flow cytometry for the measurement of TZB binding activity on HER2-positive BT474 cells. To assess the effect of the tested conditions on epithelial barrier properties after a 1 h exposure, we evaluated three parameters 24 h post-exposure: TEER variation (before and after exposure), cytotoxicity in RPMI 2650 cells using the MTT assay, and the homogeneous distribution of mucus by Alcian blue staining (Figure S3).

### *2.6. MTT Cell Toxicity Test on RPMI 2650 Cells*

Cell viability after 60 min exposure to the different concentrations was assessed using the MTT assay. The exposure solutions in the apical compartment were removed, 150 µL of 0.5 mg/mL in PBS of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution was added to each well, and the plates were incubated at 37 °C for 3 h. Then, the supernatant was removed, and 400 µL of DMSO was added to dissolve formazan crystals (Figure S3). Reduced MTT levels were determined by measuring absorbance at 590 nm using a microtiter plate reader (Spectramax). MTT reduction % was calculated as follows:

$$\%\text{MTT reduction} = (\text{ Absorbance of treated cells})/(\text{Absorbance of PBS control }) \times 100 \quad (3)$$

### *2.7. Statistics*

Analyses were performed using the Prism 9.1 program (GraphPad Software). Statistical significance was assessed by the unpaired *t*-test or one–way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc test (Tukey's multiple comparison test) for multigroup comparisons. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

## 3. Results

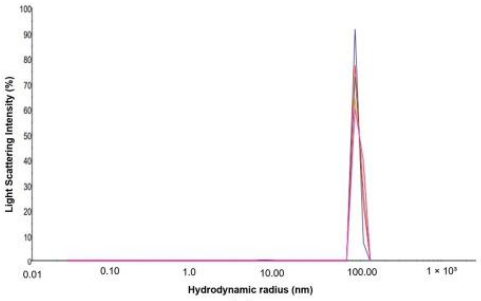
### *3.1. Nanoparticle Formulation and Characterization*

#### 3.1.1. Stability of TZB During Formulation Process

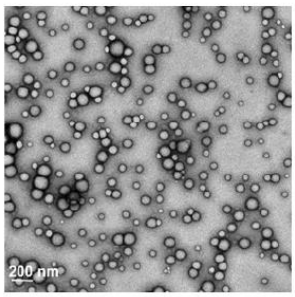
We first studied the physicochemical stability of TZB under different stress conditions (pH (6.1;7.4), sonication (30 and 60 s), five freeze–thaw cycles, and storage temperatures (37 °C, 25 °C, and 4 °C)) or over time (30 days following the applied stress) to determine the formulation conditions and parameters that could be applied to the antibody. Modifications in TZB stability were assessed by thermal denaturation profiles, detection of aggregation by DLS, and degradation of TZB by SDS-PAGE. The functionality was ultimately assessed under these different conditions by measuring the specific recognition of HER 2 receptors on the surface of BT474 cells using flow cytometry. No structural unfolding (Figures S4 and S5), aggregation, or degradation occurred (Figures S4–S6). Regarding the functionality study, the binding curves indicate that the applied stress conditions did not lead to a significant change in the apparent Kd of TZB binding to its receptors. However, over time, and specifically at day 30, an increase in the apparent Kd was observed for TZB stored at 37 °C (Figure S7).

#### 3.1.2. Physicochemical Characterization of the Formulation

The solvent-evaporation double-emulsion method was used to prepare TZB-loaded PLGA NPs (NP-TZBs). Various formulation parameters—including polymer type and concentration, stabilizer type, organic-to-aqueous phase ratio, as well as TZB loading and concentration—were investigated (Figure S8) before selecting the final candidate formulation. The resulting NPs were spherical with a smooth, nearly neutral surface (zeta potential $-2 \pm 4$ mV) and narrow size distribution with a mean hydrodynamic radius of around 100 nm (Figure 1). The size distribution was homogeneous, with a polydispersity index of less than 20%.




(**a**)




(**b**)

| Formulation code | Mean Hydrodynamic Radius (nm) | PDI (%) | Mean Zeta Potential ± SD (mV) |
|---|---|---|---|
| NP-TZB | 100.8 ± 6.3 | 9.4 ± 1.8 | -1.9 ± 4.07 |
| NP | 100.2 ± 3.1 | 9.6 ± 0.9 | -9.87 ± 9.8 |

(**c**)

**Figure 1.** Nanoparticle characteristics. (**a**) Size distribution diagram of TZB-loaded PLGA nanoparticles (NP-TZBs) obtained by dynamic light scattering (colors represent the profile of repeated measurements of the same sample). (**b**) Transmission electron microscope image of the nanoparticles. (**c**) Summary table of the mean hydrodynamic diameters, nanoparticle polydispersity index (PDI), and surface charge (zeta potential) measurements of NPs and NP-TZBs (means ± SD, n = 3).

### 3.1.3. Nanoparticle Release Kinetics and Characterization of TZB Released from PLGA Nanoparticles

The stability of TZB over time was first confirmed under the kinetic study conditions in PBS, plasma, and nasal mucus at 37 °C (Figure 2a). The release kinetics of TZB from NPs in PBS (pH 7.4), rat plasma, and nasal mucus at 37 °C were monitored for several days. As shown in Figure 2, the release profile clearly exhibited an initial burst release in the different media (Figure 2b–d). These results indicate that the initial rapid release in PBS is similar to that in plasma and even more pronounced in nasal mucus. More precisely 42.6% ± 4.40% of TZB was released in PBS within 24 h (Figure 2e), 50.38% ± 7.54% was observed in plasma (Figure 2f), and 85.49% ± 16.87% in mucus (Figure 2g). Considering the known mucociliary transit time of 12 to 15 min, our results revealed a release profile after 1 h indicating that 79% remained in its NP-TZB form (21% of TZB released) and potentially available for epithelial transport to the brain.

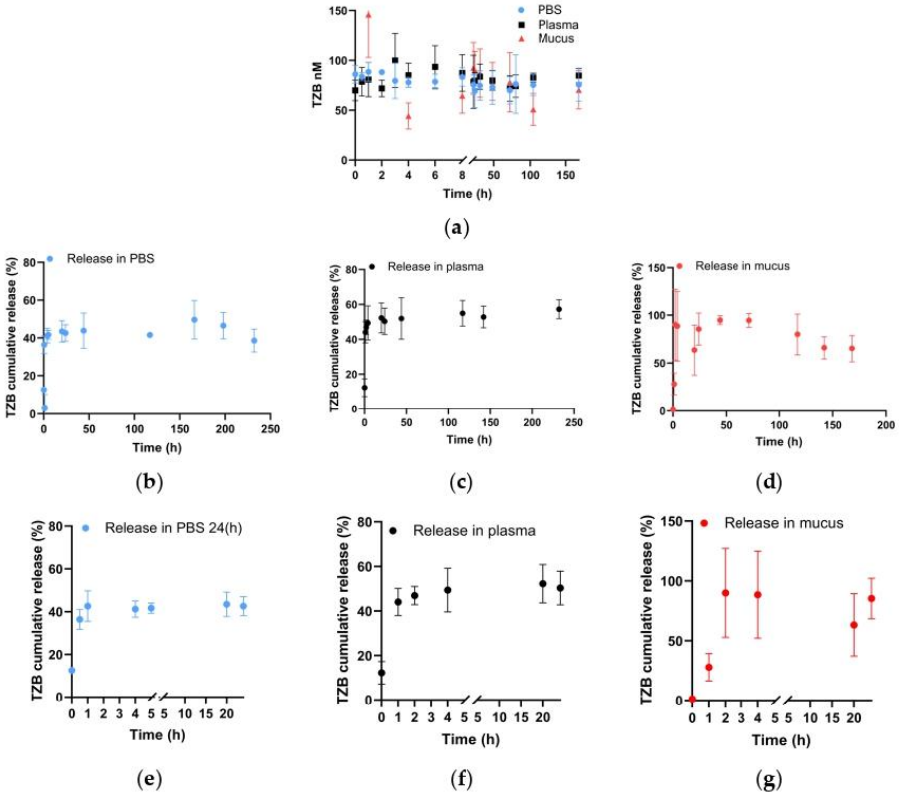
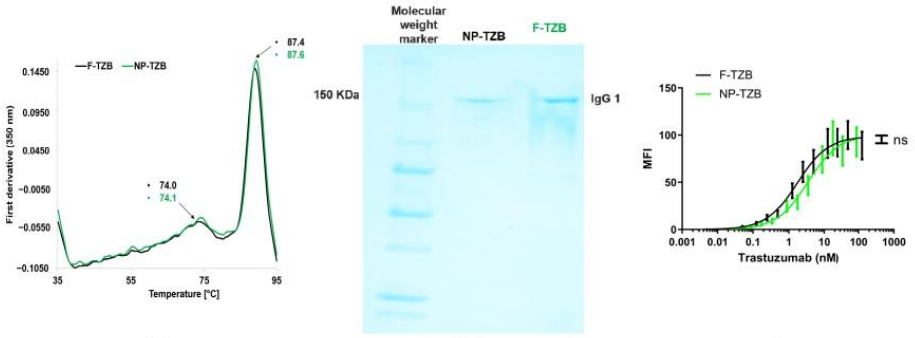



**Figure 2.** In vitro release profiles of TZB from PLGA nanoparticles in PBS, plasma, and mucus over time. (**a**) TZB stability in PBS, plasma, and mucus at 37 °C for up to 168 h. (**b**) TZB release profile from NPs in PBS at 37 °C for up to 232 h. (**c**) TZB release profile from NPs in plasma at 37 °C for up to 232 h. (**d**) TZB release profile from NPs in mucus at 37 °C for up to 168 h. (**e–g**) show the release profile during the first 24 h in PBS, plasma, and nasal mucus, respectively. TZB was quantified by ELISA assay. Concentrations of TZB expressed as a percentage of the initial TZB loaded in NPs (means ± SD, n = 3).

To ensure that the formulation process did not induce structural or functional alterations, the characteristics of the released TZB were assessed and compared to those of native TZB. Structural modifications were investigated using SDS-PAGE and thermal denat-

uration curves. Analysis of the first derivative spectra of native and released TZB revealed no significant differences, as confirmed by the SDS-PAGE gels (Figure 3a,b). Additionally, the binding profile on BT474 cells remained unchanged, indicating that TZB functionality was preserved (Figure 3c).




(**a**) (**b**) (**c**)

**Figure 3.** Structural and functional characterization of TZB released from PLGA nanoparticles (NP-TZBs) compared to native, non-formulated TZB (F-TZB) in PBS (pH 7.4) at 37 °C; (**a**) SDS-PAGE of TZB; (**b**) spectra of first derivative of the fluorescence emission as a function of temperature from thermal denaturation assays; (**c**) flow cytometry analysis of TZB binding affinity to HER2-overexpressing BT474 cells n = 2. MFI: mean fluorescence intensity; ns = not significant ($p > 0.05$).

### *3.2. Permeability Studies on In Vitro Models*

#### 3.2.1. Integrity Studies in ALI Model

Nasal formulations must also preserve barrier integrity, epithelial cell viability, and mucus production functionality. TEER monitoring before and after exposure confirmed that applying free-TZB (F-TZB), NPs, and NP-TZBs at concentrations of 150 nM (C1) or 700 nM (C2) did not compromise barrier integrity (PBS and DMSO included as negative and positive controls (Figure 4a)). Moreover, after 1 h of exposure to the highest concentration of TZB (C2 700 nM), Alcian blue staining still showed a homogeneous distribution of mucus on the epithelial surface (Figure 4c–g). Finally, to evaluate the impact of NPs and TZB on cell viability, we conducted an MTT cytotoxicity assay, confirming that the formulation did not induce cellular toxicity. No changes in cell viability in response to either F-TZB, NP-TZBs, or empty NPs were observed (Figure 4b).

#### 3.2.2. Permeability Across the Nasal Epithelium Study on RPMI 2650 Barrier Model

A study of in vitro permeability is necessary to predict in vivo nasal absorption and to understand drug pharmacokinetics. Permeability studies of free and encapsulated TZB were performed on an in vitro nasal epithelial model using RPMI 2650 cells. Figure 5 illustrates the time-dependent accumulation (1 h, 5 h, or 24 h) of TZB in the basal compartment following exposure to different concentrations of NP-TZBs and F-TZB (150 and 700 nM).

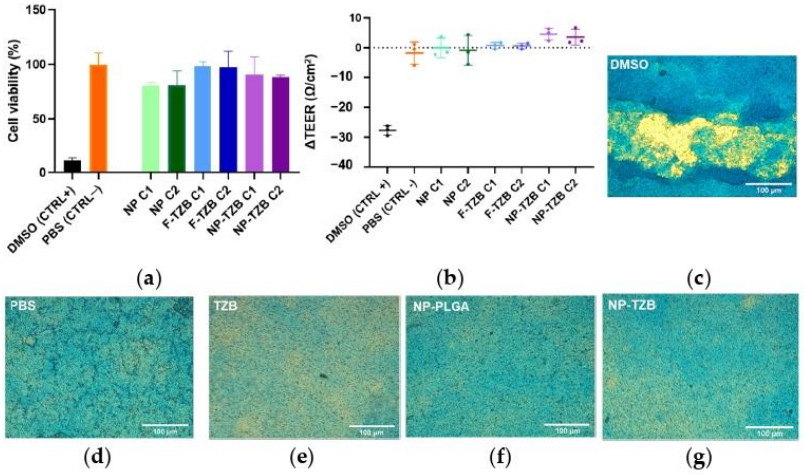



**Figure 4.** Impact of 150 nm (C1) and 700 nM (C2) formulation on barrier integrity, cell function, and cell viability. (**a**) Cell viability percentage after exposure; (**b**) TEER variation before and after exposure; and (**c**–**g**) Alcian blue staining for TZB and NP-TZB concentration 700 nM (scale bar 100 µm); data are expressed as (means ± SD, n = 3).

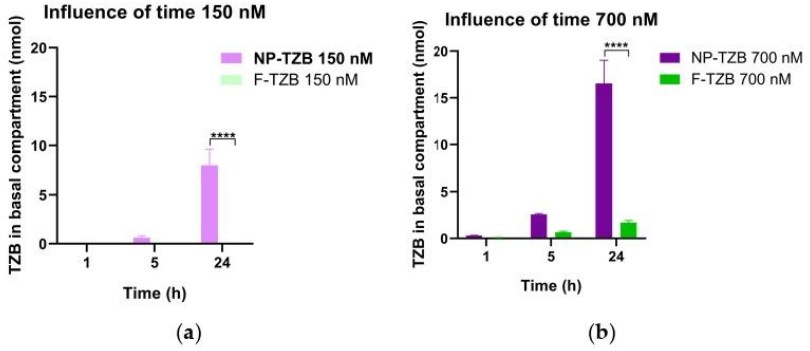



**Figure 5.** Transport of NP-TZBs and F-TZB over time across the RPMI 2650 nasal epithelium model at different exposure concentrations. Cells were exposed to two different concentrations of TZB (150 nM and 700 nM) of either NP-TZBs or F-TZB for 1 h. (**a**) Influence of time on the transport of TZB at 150 nM; (**b**) Influence of time on the transport of TZB at 150 nM. Quantification of TZB in the basal compartment was performed 1 h, 5 h, and 24 h after treatment in the apical compartment. Data are expressed as mean ± standard deviation from three independent experiments (means ± SD, n = 3). Statistical analyses were performed using two-way ANOVA (time and concentration) followed by Tukey's multiple comparisons test, **** $p < 0.0001$.

Regardless of whether F-TZB or NP-TZBs were applied to the apical compartment and irrespective of the concentration used (150 nM or 700 nM), only a small amount of TZB was detected in the basal compartment after 1 h of exposure. At the lowest concentration (150 nM), TZB remained undetectable in the basal compartment for the F-TZB formulation. Increasing the apical concentration of TZB enhanced its passage, as evidenced by measurable, though low, amounts of TZB in the basal compartment for F-TZB at 700 nM. A similar trend was observed for NP-TZBs, where higher apical concentrations led to greater TZB accumulation in the basal compartment. After 5 h of exposure, TZB remained undetectable in the basal compartment for F-TZB at 150 nM. However, at 700 nM, the amount of F-TZB in the basal compartment increased compared to the 1 h time point.

A similar increase over time was observed for NP-TZBs at both concentrations. This time-dependent enhancement in permeability was even more pronounced at 24 h. At 700 nM, the amount of F-TZB in the basal compartment increased from 0.67 ± 0.08 nmol at 5 h to 1.69 ± 0.19 nmol at 24 h, while for NP-TZBs, it increased from 2.58 ± 0.08 nmol to 16.55 ± 2.02 nmol over the same period. These results indicate that both the apical concentration of TZB and the duration of exposure significantly influence its permeability across the epithelium. Notably, the NP formulation significantly enhanced TZB transport, with NP-TZBs reaching basal concentrations nine times higher (16.55 ± 2.47 nmol) than F-TZB (1.69 ± 0.23 nmol). This highlights the superior permeability properties of the NP formulation compared to the free drug.

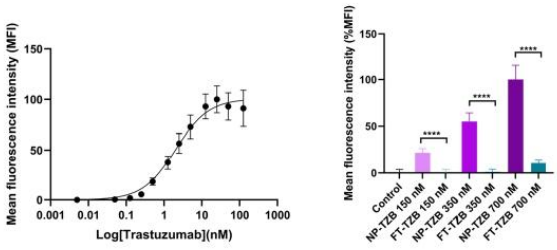
#### 3.2.3. Binding Specificity of Both Encapsulated and Free TZB After Crossing the In Vitro Nasal Epithelium

Samples collected from the basal compartment after 24 h of passage across the nasal epithelium model were analyzed by flow cytometry to assess whether TZB remained functional in targeting HER2. For this experiment, we added an intermediate condition of 350 nM to better assess the dose effect. The binding study was conducted on BT474 cells, which express the HER2 receptor. BT474 cells were exposed to the basal medium, rinsed, and then incubated with a secondary antibody (Figure S9). The MFI signal, correlating with TZB concentration, was measured by flow cytometry. To validate the experiments, BT474 cells were also exposed to a range of TZB concentrations as a reference. Figure 6a presents the saturation binding curve of TZB to BT474 cells, with an apparent dissociation constant (Kd) of 2 nM. TZB from the basal compartment (F-TZB or NP-TZB exposure experiments) is specifically bound to BT474 cells. We observed a high MFI with NP-TZBs at 700 nM, reaching 45.98, which was normalized to 100% relative to the MFI signal of the negative control (BT474 treated with PBS), measured at 1.42 and normalized to 0 (Figure 6b). In line with the minimal amounts of TZB detected in the basal compartment following treatment with F-TZB, the MFI signal remained low at 150 nM and 350 nM. At the highest concentration of 700 nM, the maximum signal observed was 10% (MFI 6.14), which corresponds to a tenth of the signal obtained with NP-TZB exposure. These findings are consistent with the permeability quantification results presented in the previous section. Indeed, at a concentration of 700 nM, NP-TZB-treated cells showed an MFI of 100% (45.98 ± 6.85) and F-TZB-treated cells only 10% (6.14 ± 1.36) (Figure 6; $p < 0.001$). Additionally, NP-TZBs displayed a dose-dependent increase in binding specificity, with the highest concentration yielding the strongest fluorescence signal. In contrast, F-TZB showed minimal binding and no significant dose-dependent increase. These results suggest that NP encapsulation not only facilitates TZB transport across the nasal epithelium but could also provide protection that helps preserve its functionality after passage through the nasal barrier.

#### 3.2.4. Permeability Study on BBB

Given the vascularization of the in vivo nasal epithelium, a fraction of the administered drug will be absorbed into the bloodstream and distributed systemically. The release profile of TZB from NPs in rat plasma at 37 °C showed that only 49.42% was released after 4 h (Figure 2), indicating that 50% of NP-TZBs circulating in the bloodstream will encounter the BBB. To evaluate whether the NP-TZB formulation could enhance BBB permeability, we conducted a permeability assay using an in vitro BBB model. After administering 190 nM TZB to the apical compartment, as expected, the TZB concentration in the basal compartment of F-TZB remained undetectable (below the detection limit of 0.07 nM) after 2 h of exposure. The same observation was made with NP-TZBs, suggesting that the NP does not enhance passage across the BBB. To further assess the safety of the formulation, we

evaluated its cytotoxicity on astrocyte cells and brain endothelial cells using a cell viability assay. The results demonstrated no significant reduction in cell viability post-exposure, as illustrated in Figure S10.




| | MFI | SD |
|---|---|---|
| Control. PBS | 1.42 | 1.64 |
| NP-TZB 150nM | 10.96 | 1.99 |
| FT-TZB 150nM | 1.57 | 1.51 |
| NP-TZB 350nM | 25.94 | 4.11 |
| FT-TZB 350nM | 3.74 | 1.34 |
| NP-TZB 700nM | 45.98 | 6.85 |
| FT-TZB 700nM | 6.14 | 1.36 |

(**a**) (**b**) (**c**)

**Figure 6.** Flow cytometry analysis of the binding affinity of TZB that has crossed the nasal mucosa barrier in the RPMI 2650 model to HER2-positive cells (BT474). (**a**) Saturation binding curves of TZB. (**b**) Graphical representation of the MFI values of BT474 cells incubated with TZB samples that have passed through the in vitro RPMI 2650 model. Data are expressed as mean of MFI ± SD (n = 3). We normalized the data relative to NP-TZBs at 700 nM, which showed an MFI of 45.98, normalized to 100% in comparison to the MFI signal of the negative control (BT474 treated with PBS), which was measured at 1.42 and normalized to 0. (**c**) Summary of the actual MFI results obtained for each exposure condition. Statistical analyses were performed by using two-way ANOVA (time and concentration) followed by Tukey's multiple comparisons test, **** $p < 0.0001$.

## 4. Discussion

Drug uptake into the brain is challenging, especially for therapeutic antibodies [25]. The N2B approach emerges as an attractive alternative, enabling direct delivery of drugs to the brain with ease, speed, efficiency, and safety. However, this route of administration still presents challenges, including mucociliary clearance, limited administration volume, positioning in the posterior part of the olfactory mucosa within the nasal cavity, and enzyme-related metabolism, hence the need to design a suitable administration system and device to address these issues. Nanotechnology offers a compelling approach for N2B drug delivery, holding immense promise for enhancing therapeutic outcomes. Employing NPs can effectively prolong the drug's residence time at the absorption site, facilitating its permeability through the mucosal barrier and uptake by cells. Furthermore, NPs can enhance drug solubility, enabling controlled release of the encapsulated drug and minimizing systemic side effects by restricting drug distribution to non-targeted areas. These attributes collectively establish NPs as a promising tool for N2B delivery [15]. The aim of this study was the development of a TZB formulation to be administered via the nasal route for delivery to the brain.

Several types of NP systems have been synthesized for drug delivery, including dendrimers, liposomes, and solid lipid NPs [26]. There are a number of studies that have already been conducted to define the specifications they must meet. According to the specifications needed for nasal administrations, we chose PLGA, a biodegradable lactic and glycolic acid biopolymer already approved by the U.S. Food and Drug Administration and the European Medicines Agency [27]. Most formulation encapsulation methods are already known to induce stress conditions that can severely affect protein stability, integrity, and function [28]. It is therefore essential to verify the integrity and functionality of proteins released from delivery systems. Antibody instability can be due to exposure to organic solvents, shear stress during agitation, freezing, elevated temperature, pH, light, adsorption, and salts. The double emulsion solvent evaporation formulation method used in this study

presents two potential critical steps that might lead to antibody degradation or denaturation. The first is emulsification, which exposes the protein to a water/oil interface, and the second is sonication, which introduces mechanical stress and exposure to the air–liquid interface. When antibodies are exposed to a water/oil interface, they tend to adsorb to hydrophobic surfaces and can form aggregates and disintegrate. To address stability concerns, we included interface stabilizers like PVA and poloxamer 188, which are nonionic surfactants, to enhance TZB stability by preventing its interaction with water/oil interfaces. As the surface is predominantly occupied by surfactant molecules, only a limited amount of TZB is adsorbed. This helps reduce secondary structural alterations and instability [29]. Agitation leads, on the one hand, to the creation of bubbles, thus creating and constantly renewing air–water interfaces. The increase in exposed hydrophobic surfaces due to agitation stress will therefore hinder TZB stability, as mentioned above [30]. On the other hand, sonication generates shock-induced cavities, leading to intense localized temperature and pressure spikes and free radical formation, all of which can destabilize antibodies. To mitigate this instability, we employed cold sonication (in an ice bath), minimized exposure duration, and conducted agitation for brief 10 s intervals. Studies were carried out as preliminary work prior to this study. These strategies enabled us to stabilize TZB during the formulation process, as evident from the unchanged binding affinity (Kd) determined through HER2 receptor recognition studies. This first step allowed the selection of one lead formulation that was characterized for key parameters. Particle size is one of the most crucial parameters that can determine the ability to cross the nasal olfactory mucosa [31,32].

The nasal mucosa has a relatively high permeability flexibility compared to other physiological membranes. There are no reports regarding the optimal particle or molecular size for nasal administration. However, given that the diameter of olfactory axons is known to be 0.1–0.7 µm, there may be a size threshold that limits particle size to the nanometer range [33]. Rejman and colleagues employed polystyrene-labeled NPs of varying sizes (50, 100, 200, 500, and 1000 nm) to examine the pathways involved in NP internalization. Their findings demonstrated that particles smaller than 200 nm were internalized through clathrin-coated pits, while particles between 200 and 1000 nm were internalized via caveolae-mediated endocytosis [34]. Overall, the smaller the NPs, the more efficiently they are absorbed through the nasal epithelium [32]. Also, mucus has a mesh-like structure that allows the penetration of particles less than 1 µm in diameter [35]. Consequently, therapeutic agents must be small enough to penetrate mucus. Mucus can also filter by means of interactions, irrespective of particle size. These interactions include electrostatic forces, hydrophobic forces, and van der Waals bonds [36]. In addition to the effect of axon diameter, Ahmad et al. showed an effect of size on residence time on the nasal mucosa in a biodistribution study of nanoemulsions of different sizes containing different fluorescent markers. Fluorescence images show that nanoemulsions smaller than 100 nm have longer residence times and slower mucociliary clearance in the nasal epithelium than larger NPs (200, 500, and 900 nm), regardless of the presence of chitosan [37].

We obtained PLGA NPs of diameter around 200 nm and a smooth, spherical shape that appears compatible with absorption across the nasal epithelium. The presence of TZB in the formulation had no impact on NP size. These characteristics are similar to those obtained by several authors who formulate PLGA NPs using the solvent evaporation method [38]. In addition to size, surface properties, particularly surface charge or the presence of specific proteins, are also important [15]. We obtain neutral particles, while it is widely acknowledged that positively charged nanocarriers can effectively adhere to the negatively charged mucus layer lining the nasal cavity, extending their residence time and enabling sustained drug delivery [39]. Neutral particles, on the other hand, bypass these electrostatic interactions, improving their diffusion and potentially enhancing NP

absorption [40]. NP-TZB formulations have shown prolonged release of TZB, peaking after 24 h. According to literature studies of protein release from PLGA NPs, the release profile begins in a burst, followed by a low and incomplete release estimated at less than 70% after 48 h in general. Our results are consistent with those of previous studies, as we observed a similar profile [41]. The initial burst release observed is likely due to drug molecules adsorbed at or near the nanoparticle surface, followed by a slower release phase corresponding to diffusion through the polymer matrix and PLGA erosion. Although release appeared to reach a plateau early, the total released amount remained under 50%, reflecting the limited mobility of large biomolecules such as TZB (~150 kDa) within the matrix. Moreover, under physiological conditions (pH < 7.4), TZB carries a net positive charge due to its isoelectric point (pI = 8.7), leading to electrostatic interactions with the negatively charged carboxyl end groups of PLGA. These interactions likely hinder its diffusion and contribute to the incomplete release.

After preparing the NPs (NP-TZBs), their passage through the in vitro nasal barrier model with RPMI 2650 cells was evaluated. In this experiment, we compared the passage of F- TZB and NP-TZBs. We initially observed a limited crossover of F-TZB. Research has shown that neonatal Fc receptors (FcRn) are involved in the intranasal transport of IgGs across the nasal epithelium, which may explain the observed passage of TZB into the basolateral compartment [42]. Mucosal epithelial cells express FcRn, a receptor that binds to the Fc region of IgG in a pH-dependent manner. Notably, IgG binds FcRn at acidic pH (~6.0) but not at physiological pH, allowing selective uptake and release. This binding mechanism enables FcRn to mediate the transcytosis of IgG across epithelial barriers via an endosomal trafficking pathway (Figure 7) [43]. As receptor-mediated mechanisms are implicated in the epithelial transport of F-TZB, it is reasonable to assume that this process could become saturated, potentially limiting the efficiency of TZB translocation.

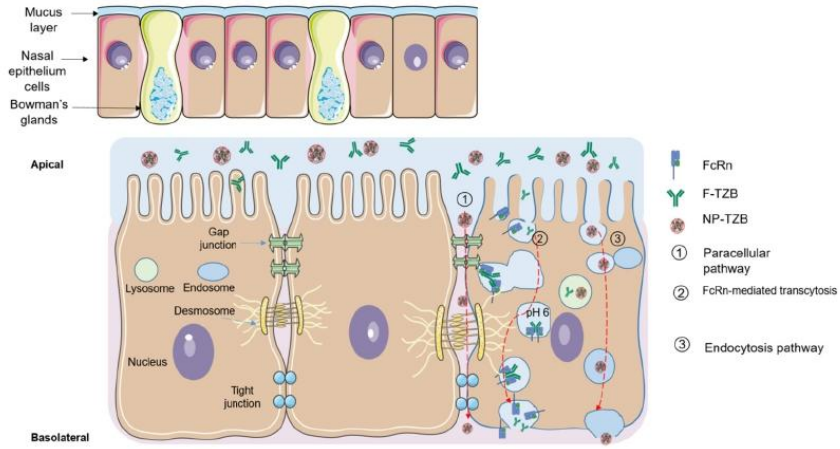



**Figure 7.** Hypothetical mechanisms of TZB and PLGA-nanoparticle passage across the nasal epithelial barrier in RPMI 2650.

By encapsulation in PLGA NPs, we were able to improve the passage of TZB by around 9.78-fold, i.e., from 1.69 ± 0.24 to 16.55 nM ± 2.48 of TZB in the basal compartment, corresponding to passage rates rising from 3.06 ± 0.42 to 18.30 ± 2.73% passage after 1 h of exposure. Our findings are consistent with those of Ladel et al., who observed IgG permeability of less than 10% in an RPMI 2650 model after 24 h of exposure [42].

The transport mechanism of PLGA nanoparticles across the nasal epithelium remains poorly characterized in the RPMI 2650 cell model. However, studies using other epithe-

lial cell lines, such as Caco-2, have demonstrated that nanoparticle translocation largely depends on surface properties. For conventional PLGA nanoparticles similar to those we formulated, transport is believed to occur through a combination of endocytic uptake and paracellular passage [44] (Figure 7). NPs offer two potential benefits for TZB delivery: enzyme protection and improved hydrophobicity. Enzyme protection ensures that TZB reaches its target intact, as ultimately demonstrated by the binding study of basal compartment solutions after exposure. Indeed, an MFI signal of 45.98 ± 6.85 was obtained for NP-TZBs, compared to 6.14 ± 1.36 for free TZB at a concentration of 700 nM. The NP can also act as a carrier, providing hydrophobicity, which enhances its interaction with cell membranes, thus facilitating passage through endocytosis.

Moreover, the in vitro cell toxicity study conducted on the RPMI 2650 cell line confirmed the safety of NPs. Additionally, extensive research highlights that N2B transport mainly relies on the neuronal pathways of the olfactory and trigeminal nerves, which are absent in the in vitro model we used. A more comprehensive approach, such as an in vivo animal model, is necessary. In vivo studies are currently underway to assess the effectiveness of our novel drug formulation in delivering TZB to the brain via the nasal route. Preliminary findings suggest a significant enhancement in brain penetration compared to previous formulations.

Consequently, the NP-PLGA formulation could enable prolonged release of TZB and improve brain distribution while preserving its activity. However, further studies are required to better understand the transport mechanisms and to demonstrate pharmacological efficacy, including in animal models. In vitro models of the nasal epithelium and BBB are strong predictors of permeability. Nevertheless, this research with promising results provides initial support for combining the nasal route with NP formulation in TZB drug delivery. More studies are still needed to fully unravel transport mechanisms and confirm pharmacological efficacy in vivo.

## 5. Conclusions

In this study, we formulated PLGA NPs loaded with TZB that have the appropriate characteristics to promote N2B passage. The TZB released from this NP system is sustained over time and is functional after release. Experiments on the in vitro RPMI 2650 cell model showed that TZB-loaded NPs increased passage 9.78-fold. The nasal administration route and the use of NPs could help optimize the cerebral bioavailability of TZB. This is due to the direct connection with the brain, which bypasses the BBB, and the ability of NPs to protect and efficiently transport TZB across the nasal epithelium. Consequently, this approach could enhance its efficacy. To further confirm our results, we intend to expand our research by employing a more extensive animal model.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics17060681/s1. Figure S1. In vitro model of nasal epithelium using RPMI 2650 cells. (a) Immortalized human nasal epithelial cells are seeded in a flask. (b) Upon reaching 80% confluence, the cells are seeded onto inserts and cultured under liquid-covered conditions (LCC) for 2 days. (c) The apical medium is then removed, and the cells are further cultured at the air-liquid interface (ALI) for 15 days to promote epithelial differentiation and barrier formation. (d) The integrity of the nasal epithelial barrier is assessed by monitoring transepithelial electrical resistance (TEER). lucifer yellow (LY) permeability and mucus production via alcian blue staining. (e) Permeability study of free trastuzumab (F-TZB) and nanoparticle-loaded trastuzumab (NP-TZB) across the epithelium. (f) Quantification of TZB in the basal compartment using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after a 24-h release process at 37 °C under agitation (1000 rpm) in a thermomixer. (g) Evaluation of the binding affinity of TZB that has passed into the basal compartment on BT474 cells which overexpress the HER2 receptor by measuring the mean fluorescence inten-

sity (MFI) using fluorescence-activated cell sorting (FACS). Abbreviations: Liquid-covered culture (LCC), air-liquid interface (ALI). Free trastuzumab (F-TZB). PLGA nanoparticle-loaded trastuzumab (NP-TZB). transepithelial electrical resistance (TEER). lucifer yellow (LY), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), fluorescence-activated cell sorting (FACS). Figure S2. Characterization of the ALI RPMI 2650 model (a) Monitoring of Transepithelial Electrical Resistance (TEER) over time. showing a progressive increase until reaching a plateau at approximately 80 Ω/cm² by day 12. (b) Lucifer Yellow (LY) permeability over time following 1 h of incubation demonstrating a gradual decrease in permeability across the nasal epithelium under ALI conditions stabilizing around day 14. (c,d) Mucus production at day 1 and day 14 under ALI conditions assessed by alcian blue staining. A time-dependent increase in mucus production was observed. (e) Evolution of mucus production over time showing an initial heterogeneous distribution that becomes more uniform by day 14. Apparent permeability coefficients (Papp) were calculated as previously described by Roux et al. (Roux et al. 2019) [45]. Briefly, the amount that crossed was calculated using the difference in LY concentration in the basal compartment (Δ[C]B) after 60 minutes and in the apical compartment at 0 h ([C]A). This was done using the formula below, which incorporates the basal compartment volume (VB; 1.5 mL) and the available permeability area (a; 1.12 $cm^2$): Papp (cm/s) = (Δ[C]B × VB)/(a × [C]A × Δt). Mucus production was quantified using the RGBb ratio obtained after Alcian Blue staining. Image analysis was performed using ImageJ software. Figure S3. Investigation of the effects of F-TZB and NP-TZB on nasal epithelial barrier integrity after 1-h exposure and experimental results 24 h post-exposure. (a) Alcian Blue staining of the epithelium to assess the uniformity of mucus distribution on the epithelial surface. (b) TEER measurements post-exposure. (c) Cytotoxicity assessment on the RPMI 2650 multilayer cell model. Experiments were performed in triplicate (n = 3). Figure S4. Effect of applied stress conditions on TZB stability and its thirty-day stability assessment. (a) Influence of formulation stress on the first-derivative intrinsic fluorescence spectra of TZB as a function of temperature showing the thermal denaturation curve. (b) Impact of applied stress on TZB hydrodynamic radius. (c) Effect of applied stress on TZB size distribution polydispersity index (PDI). To assess the influence of temperature and pH. TZB samples were subjected to a one-hour stress period before further evaluation. (d) Evolution of the fluorescence spectrum as a function of temperature illustrating the thermal denaturation curve over 30 days. (e) Time-dependent changes in hydrodynamic radius after 30 days. (f) Polydispersity index variation over 30 days. The sample was TZB at a concentration of 1mg/mL in the PBS (Phosphate Buffer Saline) buffer at pH 7.4. Data were analyzed using Excel 2019 and expressed as mean ± standard deviation (n = 3). Figure S5. Effect of applied stress conditions on TZB stability and its thirty-day stability assessment using SDS-PAGE under non-denaturing and denaturing conditions. (a) Influence of applied stress. (b) Time-dependent evolution of molecular weight and consequently the primary structure of TZB on days 30. Analysis was performed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Figure S6. Effect of applied stress conditions on TZB stability and its thirty-day stability assessment. Thermal denaturation curve with corresponding inflection temperatures. (a) Influence of applied stress on TZB stability. (b–d) Time-dependent evolution of the thermal denaturation spectrum and inflection temperatures at Days 7, 15, and 30. Figure S7. Effect of applied stress conditions on TZB stability and its thirty-day stability assessment. This figure presents the specific binding curves of TZB to its HER2 receptor on BT474 cells, along with the corresponding apparent Kd values and normalized MFI data. (a–c) Influence of applied stress conditions. (d–f) Evolution of the specific binding curve over time at Days 1, 7, 15, and 30.Abbreviations: Kd, apparent dissociation constant; MFI, mean fluorescence intensity. Figure S8. Characterization of PLGA nanoparticles size and influence of varying formulation parameters: (a) Influence of molecular weight of PLGA; (b) Effect of stabilizer type on nanoparticle size; (c) Hydrodynamic radius of NPs obtained from different concentrations and types of PLGA; (d) Impact of the organic-to-aqueous phase ratio (PO/PA1); (e) Effect of TZB presence and concentration in NPs; Data are presented as the mean ± SD from three independent experiments. Abbreviations: NPs. nanoparticles; PLGA. poly(lactic-co-glycolic acid); TZB. trastuzumab; SD. standard deviation; PO. organic phase; PA1. internal aqueous phase 1; PVA. polyvinyl alcohol; P188. poloxamer 188; DLS. dynamic light scattering. Figure S9. Protocol for

Evaluating TZB Functionality after Crossing the RPMI 2650 Epithelial Barrier. The basal compartment medium, collected 24 h after treatment in the apical compartment, was added to a suspension of 300,000 cells. After overnight incubation, the cells were washed three times with PBS buffer before adding the fluorescent secondary anti-human antibody conjugated to Alexa Fluor™ 488. Four hours later, the cells were washed three more times, fixed, and analyzed by flow cytometry to measure mean fluorescence intensity (MFI). Figure S10. Assessment of cytotoxicity on central nervous system (CNS)-related cells after 1-h exposure of 190 Nm TZB. Cell viability was evaluated using the MTT assay. Rat astrocyte cells and rat brain endothelial cells (blood–brain barrier model) were seeded in 96-well plates at a density of 3000 cells per well. Once confluence was reached, cells were exposed to the tested formulations for 1 h. After exposure, the treatment solutions were removed, and MTT solution (0.5 mg/mL) was added and incubated under standard culture conditions for 3 h. Formazan crystals were subsequently solubilized using DMSO, and absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer. (a) Viability of rat astrocyte cells. (b) Viability of rat brain endothelial cells. Experiments were performed in quintuplicate (n = 5) for astrocyte cells and n = 3 for endothelial cells.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.K.K. and D.B.; methodology, L.K.K., A.H., N.C., A.-C.G. and C.D.; validation, L.K.K., A.H. and C.D.; formal analysis, L.K.K., C.D., A.H. and D.B.; investigation, L.K.K.; resources, D.B. and A.M.; data curation, L.K.K.; writing—original draft preparation, L.K.K.; writing—review and editing, L.K.K. and D.B.; visualization, L.K.K., C.D. and D.B.; supervision, D.B.; project administration, D.B. and A.M.; funding acquisition, D.B. and A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by POC IN LABS N° 2020-0989 and ANR N2B 2024-28 N° ANR-24-CE18-6870.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All available data are reported in this article.

**Acknowledgments:** We sincerely thank Hervé Bernard for his guidance and for providing access to the lyophilizer. We also express our gratitude to Henri Bénech and Thomas Joudinaud of Ceres Brain Therapeutics for their insightful and enriching discussions. Special thanks to Emeline Chu-Van for making the sonicator available and to Edmond Gravel for providing access to and training on the zeta potential measurement device. Finally, we greatly appreciate Cyril Lherminier's assistance with the flow cytometry experiments. The illustrations were generated using BioRender.com and Servier Medical Art (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/, accessed on 5 May 2025).

**Conflicts of Interest:** A.M. is a co-founder of Ceres Brain Therapeutics. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

| | |
|---|---|
| ALI | Air–liquid interface cultivation |
| BBB | Blood–brain barrier |
| BMs | Brain metastases |
| BSA | Bovine serum albumin |
| DLS | Dynamic light scattering |
| EE | Encapsulation efficiency |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| HER2 | Human epidermal growth factor receptor 2 |
| IgG | Immunoglobulin G |
| MFI | Mean fluorescence intensity |
| N2B | Nose-to-brain |

| | |
|---|---|
| NPs | Nanoparticles |
| NP-TZBs | Trastuzumab-loaded nanoparticles |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PLGA | Poly(lactic-co-glycolic) acid |
| PVA | Polyvinyl alcohol |
| SD | Standard deviation |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl–sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| TEER | Transepithelial electrical resistance |
| TZB | Trastuzumab |
| ZP | Zeta potential |

## References


1. Amsbaugh, M.J.; Kim, C.S. Brain Metastasis. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023.
2. Caroli, M.; Di Cristofori, A.; Lucarella, F.; Raneri, F.A.; Portaluri, F.; Gaini, S.M. Surgical Brain Metastases: Management and Outcome Related to Prognostic Indexes: A Critical Review of a Ten-Year Series. *ISRN Surg.* **2011**, *2011*, 207103. [CrossRef] [PubMed]
3. Garcia-Alvarez, A.; Papakonstantinou, A.; Oliveira, M. Brain Metastases in HER2-Positive Breast Cancer: Current and Novel Treatment Strategies. *Cancers* **2021**, *13*, 2927. [CrossRef]
4. Khan, M.; Lin, J.; Liao, G.; Tian, Y.; Liang, Y.; Li, R.; Liu, M.; Yuan, Y. Whole Brain Radiation Therapy Plus Stereotactic Radiosurgery in the Treatment of Brain Metastases Leading to Improved Survival in Patients with Favorable Prognostic Factors. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 205. [CrossRef]
5. van Grinsven, E.E.; Nagtegaal, S.H.J.; Verhoeff, J.J.C.; van Zandvoort, M.J.E. The Impact of Stereotactic or Whole Brain Radiotherapy on Neurocognitive Functioning in Adult Patients with Brain Metastases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oncol. Res. Treat.* **2021**, *44*, 622–636. [CrossRef]
6. Pinto, A.C.; Ades, F.; de Azambuja, E.; Piccart-Gebhart, M. Trastuzumab for Patients with HER2 Positive Breast Cancer: Delivery, Duration and Combination Therapies. *Breast* **2013**, *22*, S152–S155. [CrossRef]
7. Swain, S.M.; Shastry, M.; Hamilton, E. Targeting HER2-Positive Breast Cancer: Advances and Future Directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2023**, *22*, 101–126. [CrossRef]
8. Wu, D.; Chen, Q.; Chen, X.; Han, F.; Chen, Z.; Wang, Y. The Blood–Brain Barrier: Structure, Regulation, and Drug Delivery. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8*, 217. [CrossRef]
9. Terrell-Hall, T.B.; Nounou, M.I.; El-Amrawy, F.; Griffith, J.I.G.; Lockman, P.R. Trastuzumab Distribution in an In-Vivo and in-Vitro Model of Brain Metastases of Breast Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 83734–83744. [CrossRef]
10. Lockman, P.R.; Mittapalli, R.K.; Taskar, K.S.; Rudraraju, V.; Gril, B.; Bohn, K.A.; Adkins, C.E.; Roberts, A.; Thorsheim, H.R.; Gaasch, J.A.; et al. Heterogeneous Blood–Tumor Barrier Permeability Determines Drug Efficacy in Experimental Brain Metastases of Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 5664–5678. [CrossRef]
11. Dijkers, E.C.; Oude Munnink, T.H.; Kosterink, J.G.; Brouwers, A.H.; Jager, P.L.; de Jong, J.R.; van Dongen, G.A.; Schröder, C.P.; Lub-de Hooge, M.N.; de Vries, E.G. Biodistribution of 89Zr-Trastuzumab and PET Imaging of HER2-Positive Lesions in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *87*, 586–592. [CrossRef]
12. Bartsch, R.; Berghoff, A.S.; Furtner, J.; Marhold, M.; Bergen, E.S.; Roider-Schur, S.; Starzer, A.M.; Forstner, H.; Rottenmanner, B.; Dieckmann, K.; et al. Trastuzumab Deruxtecan in HER2-Positive Breast Cancer with Brain Metastases: A Single-Arm, Phase 2 Trial. *Nat. Med.* **2022**, *28*, 1840–1847. [CrossRef] [PubMed]
13. Jerusalem, G.; Park, Y.H.; Yamashita, T.; Hurvitz, S.A.; Modi, S.; Andre, F.; Krop, I.E.; Gonzàlez Farré, X.; You, B.; Saura, C.; et al. Trastuzumab Deruxtecan in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Patients with Brain Metastases: A DESTINY-Breast01 Subgroup Analysis. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 2754–2762. [CrossRef] [PubMed]
14. Patharapankal, E.J.; Ajiboye, A.L.; Mattern, C.; Trivedi, V. Nose-to-Brain (N2B) Delivery: An Alternative Route for the Delivery of Biologics in the Management and Treatment of Central Nervous System Disorders. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 66. [CrossRef]
15. Lee, D.; Minko, T. Nanotherapeutics for Nose-to-Brain Drug Delivery: An Approach to Bypass the Blood Brain Barrier. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 2049. [CrossRef]
16. Jeong, S.-H.; Jang, J.-H.; Lee, Y.-B. Drug Delivery to the Brain via the Nasal Route of Administration: Exploration of Key Targets and Major Consideration Factors. *J. Pharm. Investig.* **2023**, *53*, 119–152. [CrossRef]
17. Sonvico, F.; Clementino, A.; Buttini, F.; Colombo, G.; Pescina, S.; Stanisçuaski Guterres, S.; Raffin Pohlmann, A.; Nicoli, S. Surface-Modified Nanocarriers for Nose-to-Brain Delivery: From Bioadhesion to Targeting. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 34. [CrossRef]

18. Ismail, R.; Sovány, T.; Gácsi, A.; Ambrus, R.; Katona, G.; Imre, N.; Csóka, I. Synthesis and Statistical Optimization of Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles Encapsulating GLP1 Analog Designed for Oral Delivery. *Pharm. Res.* **2019**, *36*, 99. [CrossRef]
19. Reichl, S.; Becker, K. Cultivation of RPMI 2650 Cells as an In-Vitro Model for Human Transmucosal Nasal Drug Absorption Studies: Optimization of Selected Culture Conditions. *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *64*, 1621–1630. [CrossRef]
20. Kreft, M.E.; Jerman, U.D.; Lasič, E.; Lanišnik Rižner, T.; Hevir-Kene, N.; Peternel, L.; Kristan, K. The Characterization of the Human Nasal Epithelial Cell Line RPMI 2650 Under Different Culture Conditions and Their Optimization for an Appropriate in Vitro Nasal Model. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 665–679. [CrossRef]
21. Gonçalves, V.S.S.; Matias, A.A.; Poejo, J.; Serra, A.T.; Duarte, C.M.M. Application of RPMI 2650 as a Cell Model to Evaluate Solid Formulations for Intranasal Delivery of Drugs. *Int. J. Pharm.* **2016**, *515*, 1–10. [CrossRef]
22. Sibinovska, N.; Žakelj, S.; Kristan, K. Suitability of RPMI 2650 Cell Models for Nasal Drug Permeability Prediction. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *145*, 85–95. [CrossRef] [PubMed]
23. Pozzoli, M.; Sonvico, F.; Ong, H.X.; Traini, D.; Bebawy, M.; Young, P.M. Optimization of RPMI 2650 Cells as a Model for Nasal Mucosa. *Respir. Drug Deliv.* **2014**, *3*, 739–742.
24. Lacombe, O.; Videau, O.; Chevillon, D.; Guyot, A.-C.; Contreras, C.; Blondel, S.; Nicolas, L.; Ghettas, A.; Bénech, H.; Thevenot, E.; et al. In Vitro Primary Human and Animal Cell-Based Blood−Brain Barrier Models as a Screening Tool in Drug Discovery. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 651–663. [CrossRef]
25. Kouhi, A.; Pachipulusu, V.; Kapenstein, T.; Hu, P.; Epstein, A.L.; Khawli, L.A. Brain Disposition of Antibody-Based Therapeutics: Dogma, Approaches and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6442. [CrossRef]
26. Alshawwa, S.Z.; Kassem, A.A.; Farid, R.M.; Mostafa, S.K.; Labib, G.S. Nanocarrier Drug Delivery Systems: Characterization, Limitations, Future Perspectives and Implementation of Artificial Intelligence. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 883. [CrossRef]
27. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Préat, V. PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 505–522. [CrossRef]
28. Bilati, U.; Allémann, E.; Doelker, E. Nanoprecipitation versus Emulsion-Based Techniques for the Encapsulation of Proteins into Biodegradable Nanoparticles and Process-Related Stability Issues. *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6*, 74. [CrossRef]
29. Zhang, Z.; Marie Woys, A.; Hong, K.; Grapentin, C.; Khan, T.A.; Zarraga, I.E.; Wagner, N.J.; Liu, Y. Adsorption of Non-Ionic Surfactant and Monoclonal Antibody on Siliconized Surface Studied by Neutron Reflectometry. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *584*, 429–438. [CrossRef]
30. Le Basle, Y.; Chennell, P.; Tokhadze, N.; Astier, A.; Sautou, V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109*, 169–190. [CrossRef]
31. Formica, M.L.; Real, D.A.; Picchio, M.L.; Catlin, E.; Donnelly, R.F.; Paredes, A.J. On a Highway to the Brain: A Review on Nose-to-Brain Drug Delivery Using Nanoparticles. *Appl. Mater. Today* **2022**, *29*, 101631. [CrossRef]
32. Boyuklieva, R.; Pilicheva, B. Micro- and Nanosized Carriers for Nose-to-Brain Drug Delivery in Neurodegenerative Disorders. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1706. [CrossRef]
33. Morrison, E.E.; Costanzo, R.M. Morphology of Olfactory Epithelium in Humans and Other Vertebrates. *Microsc. Res. Tech.* **1992**, *23*, 49–61. [CrossRef]
34. Handa, M.; Singh, A.; Bisht, D.; Kesharwani, P.; Shukla, R. Potential of Particle Size Less than 15 Nm via Olfactory Region for Direct Brain Delivery via Intranasal Route. *Health Sci. Rev.* **2022**, *4*, 100038. [CrossRef]
35. Cone, R.A. Barrier Properties of Mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 75–85. [CrossRef]
36. Lieleg, O.; Ribbeck, K. Biological Hydrogels as Selective Diffusion Barriers. *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 543–551. [CrossRef]
37. Ahmad, E.; Feng, Y.; Qi, J.; Fan, W.; Ma, Y.; He, H.; Xia, F.; Dong, X.; Zhao, W.; Lu, Y.; et al. Evidence of Nose-to-Brain Delivery of Nanoemulsions: Cargoes but Not Vehicles. *Nanoscale* **2017**, *9*, 1174–1183. [CrossRef]
38. 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]
39. Adnet, T.; Groo, A.-C.; Picard, C.; Davis, A.; Corvaisier, S.; Since, M.; Bounoure, F.; Rochais, C.; Le Pluart, L.; Dallemagne, P.; et al. Pharmacotechnical Development of a Nasal Drug Delivery Composite Nanosystem Intended for Alzheimer's Disease Treatment. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 251. [CrossRef]
40. Groo, A.-C.; Mircheva, K.; Bejaud, J.; Ailhas, C.; Panaiotov, I.; Saulnier, P.; Ivanova, T.; Lagarce, F. Development of 2D and 3D Mucus Models and Their Interactions with Mucus-Penetrating Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules. *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 1753–1765. [CrossRef]
41. Akpinar Adscheid, S.; Rojas-Rodríguez, M.; Abdel-Hafez, S.M.; Pavone, F.S.; Schneider, M.; Türeli, A.E.; Calamai, M.; Günday-Türeli, N. Scalable Manufacturing Method for Model Protein-Loaded PLGA Nanoparticles: Biocompatibility, Trafficking and Release Properties. *Pharmaceutics* **2025**, *17*, 87. [CrossRef]

42. Ladel, S.; Maigler, F.; Flamm, J.; Schlossbauer, P.; Handl, A.; Hermann, R.; Herzog, H.; Hummel, T.; Mizaikoff, B.; Schindowski, K. Impact of Glycosylation and Species Origin on the Uptake and Permeation of IgGs through the Nasal Airway Mucosa. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1014. [CrossRef] [PubMed]
43. Foss, S.; Grevys, A.; Sand, K.M.K.; Bern, M.; Blundell, P.; Michaelsen, T.E.; Pleass, R.J.; Sandlie, I.; Andersen, J.T. Enhanced FcRn-Dependent Transepithelial Delivery of IgG by Fc-Engineering and Polymerization. *J. Control. Release* **2016**, *223*, 42–52. [CrossRef] [PubMed]
44. Wen, Z.; Li, G.; Lin, D.-H.; Wang, J.-T.; Qin, L.-F.; Guo, G.-P. Transport of PLGA nanoparticles across Caco-2/HT29-MTX co-cultured cells. *Yao Xue Xue Bao* **2013**, *48*, 1829–1835.
45. Roux, G.L.; Jarray, R.; Guyot, A.-C.; Pavoni, S.; Costa, N.; Théodoro, F.; Nassor, F.; Pruvost, A.; Tournier, N.; Kiyan, Y.; et al. Proof-of-Concept Study of Drug Brain Permeability Between in Vivo Human Brain and an in Vitro iPSCs-Human Blood-Brain Barrier Model. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16310. [CrossRef]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

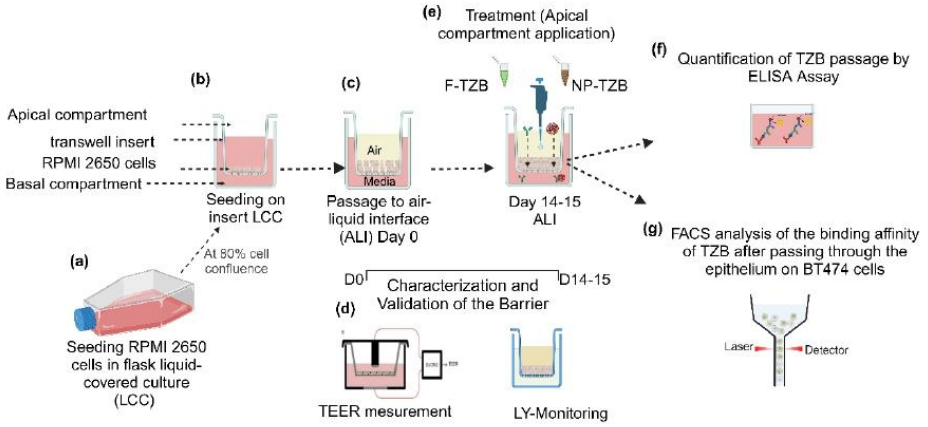



**Figure S1**. In vitro model of nasal epithelium using RPMI 2650 cells. (**a**) Immortalized human nasal epithelial cells are seeded in a flask. (**b**) Upon reaching 80% confluence, the cells are seeded onto inserts and cultured under liquid-covered conditions (LCC) for 2 days. (**c**) The apical medium is then removed, and the cells are further cultured at the air-liquid interface (ALI) for 15 days to promote epithelial differentiation and barrier formation. (**d**) The integrity of the nasal epithelial barrier is assessed by monitoring transepithelial electrical resistance (TEER). lucifer yellow (LY) permeability and mucus production via alcian blue staining. (**e**) Permeability study of free trastuzumab (F-TZB) and nanoparticle-loaded trastuzumab (NP-TZB) across the epithelium. (**f**) Quantification of TZB in the basal compartment using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after a 24-hour release process at 37°C under agitation (1000 rpm) in a thermomixer. (**g**) Evaluation of the binding affinity of TZB that has passed into the basal compartment on BT474 cells which overexpress the HER2 receptor by measuring the mean fluorescence intensity (MFI) using fluorescence-activated cell sorting (FACS). Abbreviations: Liquid-covered culture (LCC), air-liquid interface (ALI). Free trastuzumab (F-TZB). PLGA nanoparticle-loaded trastuzumab (NP-TZB). transepithelial electrical resistance (TEER). lucifer yellow (LY), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), fluorescence-activated cell sorting (FACS).

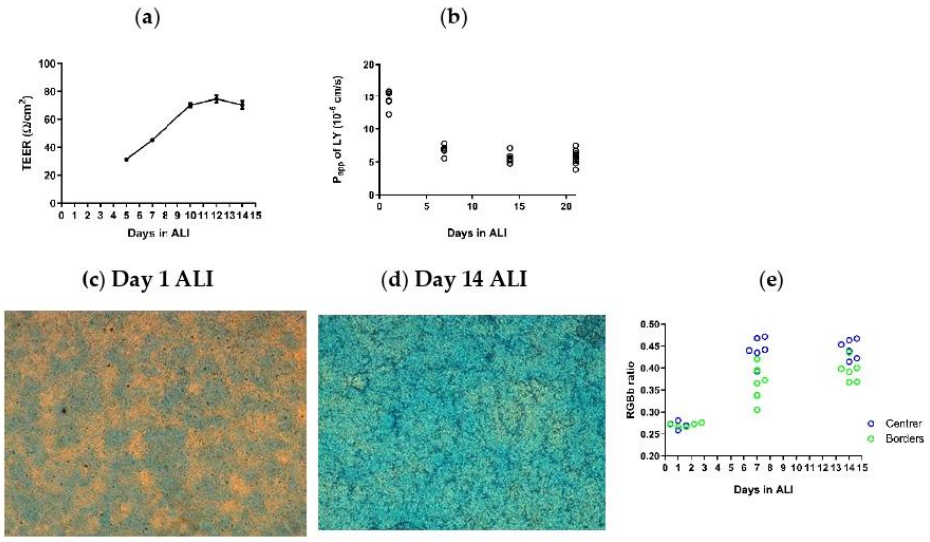



**Figure S2.** Characterization of the ALI RPMI 2650 model (**a**) Monitoring of Transepithelial Electrical Resistance (TEER) over time. showing a progressive increase until reaching a plateau at approximately 80 Ω/cm² by day 12 .(**b**) Lucifer Yellow (LY) permeability over time following 1 hour of incubation demonstrating a gradual decrease in permeability across the nasal epithelium under ALI conditions stabilizing around day 14. (**c, d**) Mucus production at day 1 and day 14 under ALI conditions assessed by alcian blue staining. A time-dependent increase in mucus production was observed. (**e**) Evolution of mucus production over time showing an initial heterogeneous distribution that becomes more uniform by day 14. Apparent permeability coefficients (Papp) were calculated as previously described by Roux et al. (Roux et al. 2019) [45]. Briefly, the amount that crossed was calculated using the difference in LY concentration in the basal compartment (Δ[C]B) after 60 minutes and in the apical compartment at 0 hours ([C]A). This was done using the formula below, which incorporates the basal compartment volume (VB; 1.5 mL) and the available permeability area (a; 1.12 cm²): Papp (cm/s) = (Δ[C]B×VB)/(a×[C]A×Δt). Mucus production was quantified using the RGBb ratio obtained after Alcian Blue staining. Image analysis was performed using ImageJ software.

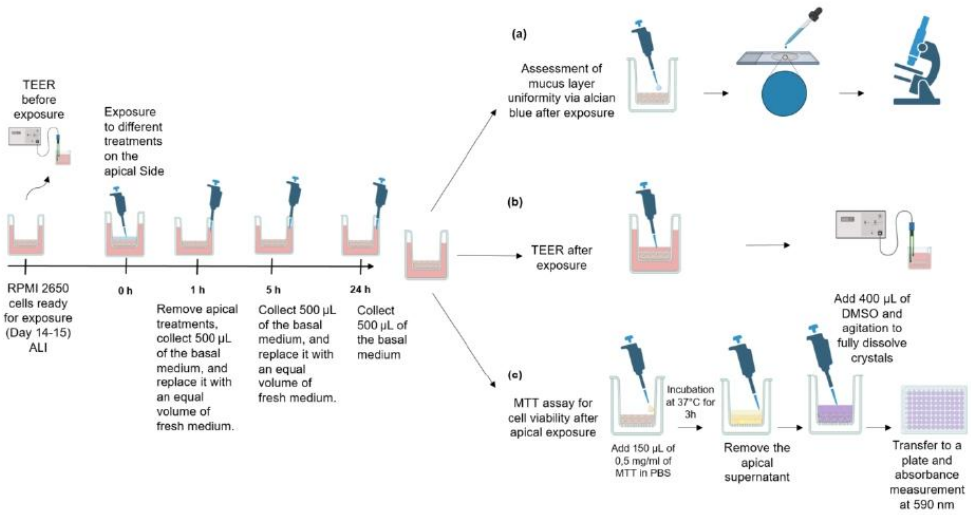



**Figure S3.** . Investigation of the effects of F-TZB and NP-TZB on nasal epithelial barrier integrity after 1-hour exposure and experimental results 24 hours post-exposure. (a) Alcian Blue staining of the epithelium to assess the uniformity of mucus distribution on the epithelial surface. (b) TEER measurements post-exposure. (c) Cytotoxicity assessment on the RPMI 2650 multilayer cell model. Experiments were performed in triplicate (n = 3).

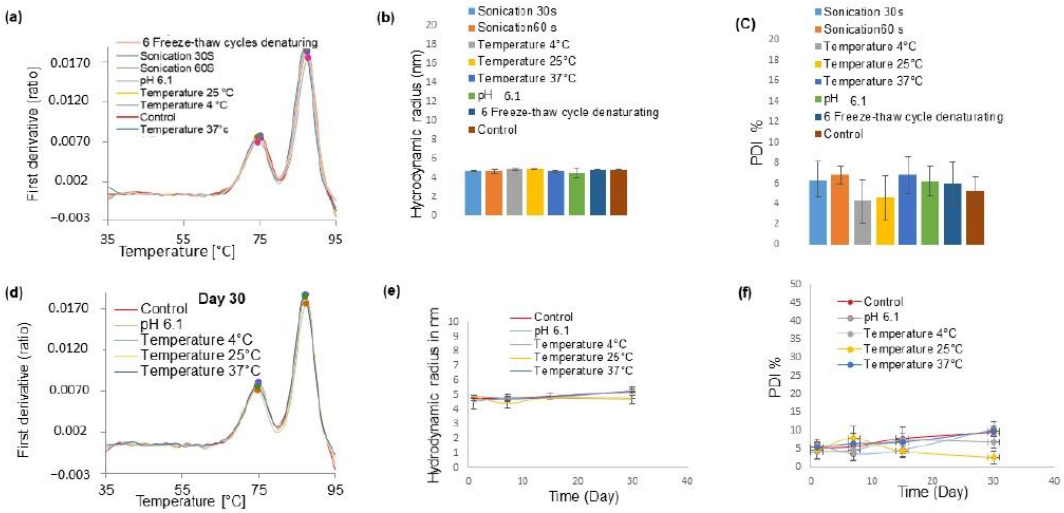



**Figure S4.** Effect of applied stress conditions on TZB stability and its thirty-day stability assessment. (**a**) Influence of formulation stress on the first-derivative intrinsic fluorescence spectra of TZB as a function of temperature showing the thermal denaturation curve. (**b**) Impact of applied stress on TZB hydrodynamic radius. (**c**) Effect of applied stress on TZB size distribution polydispersity index (PDI). To assess the influence of temperature and pH. TZB samples were subjected to a one-hour stress period before further evaluation. (**d**) Evolution of the fluorescence spectrum as a function of temperature illustrating the thermal denaturation curve over 30 days. (**e**) Time-dependent changes in hydrodynamic radius after 30 days. (**f**) Polydispersity index variation over 30 days. The sample was TZB at a concentration of 1mg/mL in the PBS (Phosphate Buffer Saline) buffer at pH 7.4. Data were analyzed using Excel 2019 and expressed as mean ± standard deviation (n=3).

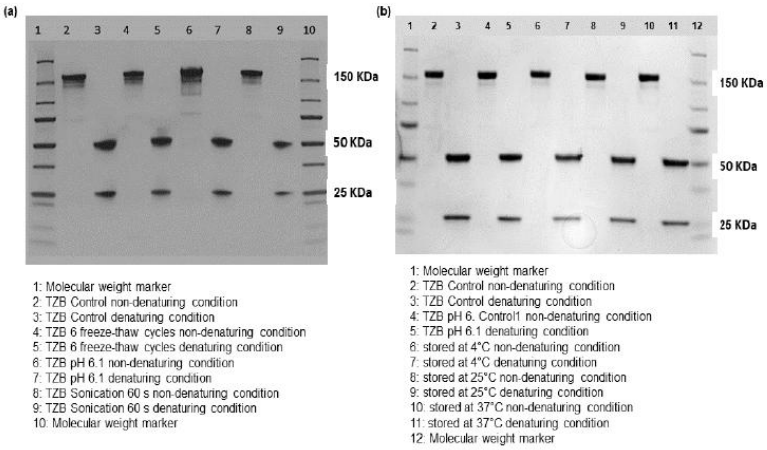



**Figure S5.** Effect of applied stress conditions on TZB stability and its thirty-day stability assessment using SDS-PAGE under non-denaturing and denaturing conditions
(**a**) Influence of applied stress. (**b.**) Time-dependent evolution of molecular weight and consequently the primary structure of TZB on days 30. Analysis was performed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

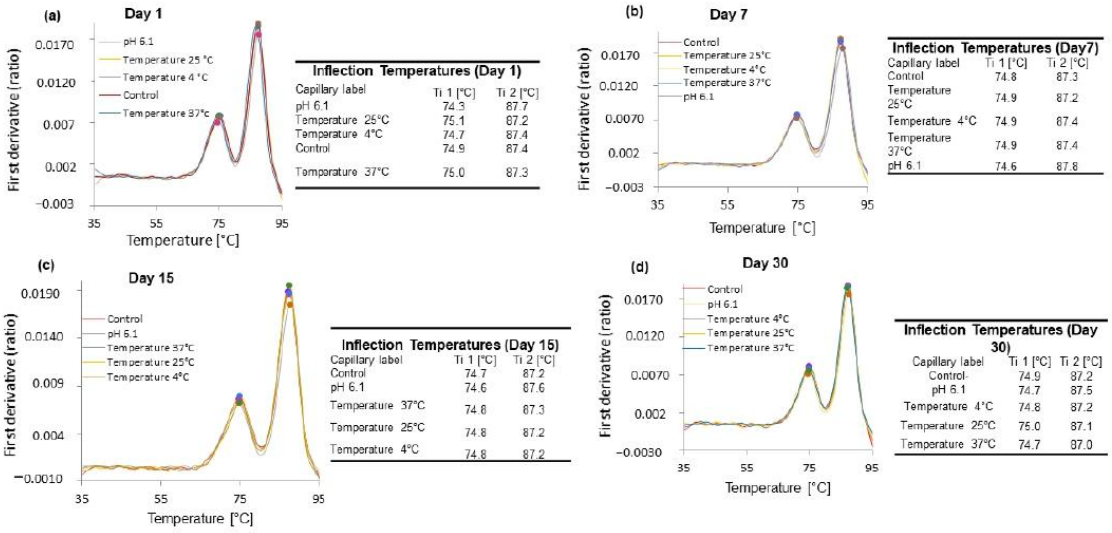
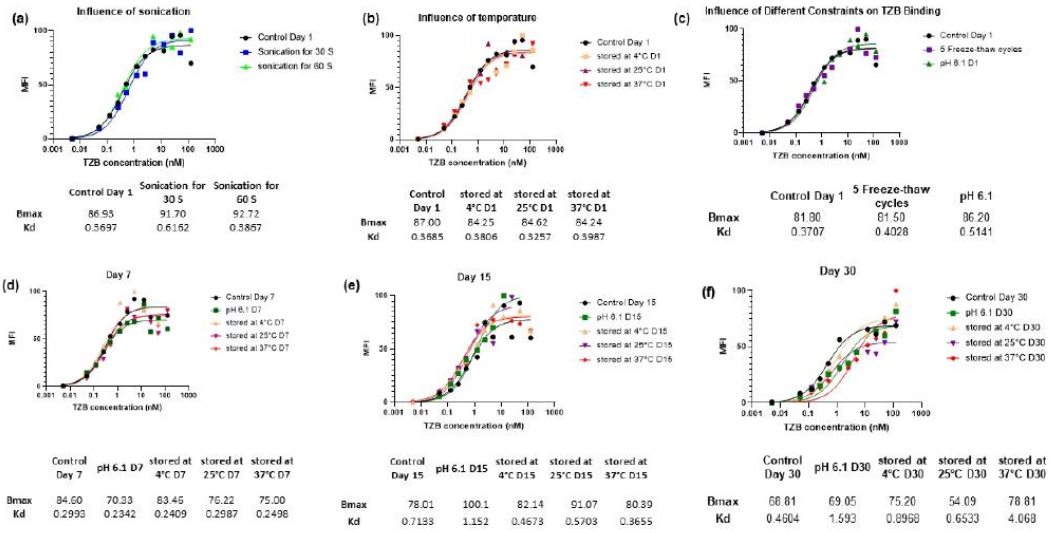



**Figure S6.** Effect of applied stress conditions on TZB stability and its thirty-day stability assessment. Thermal denaturation curve with corresponding inflection temperatures. (**a**) Influence of applied stress on TZB stability. (**b, c, d**) Time-dependent evolution of the thermal denaturation spectrum and inflection temperatures at Days 7, 15, and 30.




| | Control Day 1 | Sonication for 30 S | Sonication for 60 S |
|---|---|---|---|
| Bmax | 86.95 | 91.70 | 92.72 |
| Kd | 0.5697 | 0.6162 | 0.5857 |

| | Control Day 1 | stored at 4°C D1 | stored at 25°C D1 | stored at 37°C D1 |
|---|---|---|---|---|
| Bmax | 87.00 | 84.25 | 84.62 | 84.24 |
| Kd | 0.3685 | 0.3806 | 0.3257 | 0.3987 |

| | Control Day 1 | 5 Freeze-thaw cycles | pH 6.1 |
|---|---|---|---|
| Bmax | 81.90 | 81.50 | 86.20 |
| Kd | 0.3707 | 0.4028 | 0.5141 |

| | Control Day 7 | pH 6.1 D7 | stored at 4°C D7 | stored at 25°C D7 | stored at 37°C D7 |
|---|---|---|---|---|---|
| Bmax | 84.60 | 70.33 | 83.46 | 76.22 | 75.00 |
| Kd | 0.2993 | 0.2342 | 0.2409 | 0.2987 | 0.2498 |

| | Control Day 15 | pH 6.1 D15 | stored at 4°C D15 | stored at 25°C D15 | stored at 37°C D15 |
|---|---|---|---|---|---|
| Bmax | 78.01 | 100.1 | 82.14 | 91.07 | 80.39 |
| Kd | 0.7133 | 1.152 | 0.4673 | 0.5703 | 0.3655 |

| | Control Day 30 | pH 6.1 D30 | stored at 4°C D30 | stored at 25°C D30 | stored at 37°C D30 |
|---|---|---|---|---|---|
| Bmax | 68.81 | 69.05 | 75.20 | 54.09 | 78.81 |
| Kd | 0.4604 | 1.593 | 0.8968 | 0.6533 | 4.068 |

**Figure S7.** Effect of applied stress conditions on TZB stability and its thirty-day stability assessment.
This figure presents the specific binding curves of TZB to its HER2 receptor on BT474 cells, along with the corresponding apparent Kd values and normalized MFI data. (**a, b, c**) Influence of applied stress conditions. (**d, e, f**) Evolution of the specific binding curve over time at Days 1, 7, 15, and 30. Abbreviations: Kd, apparent dissociation constant; MFI, mean fluorescence intensity.

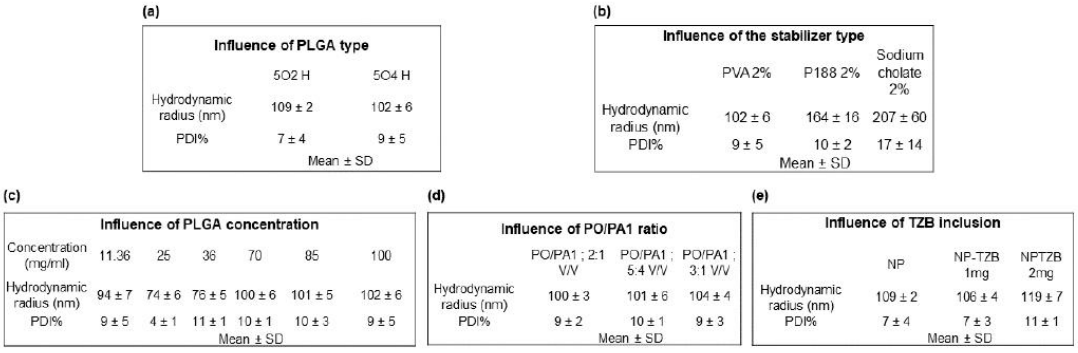



**Figure S8.** Characterization of PLGA nanoparticles size and influence of varying formulation parameters: **(a)** Influence of molecular weight of PLGA; (**b**) Effect of stabilizer type on nanoparticle size; (**c**) Hydrodynamic radius of NPs obtained from different concentrations and types of PLGA; (**d**) Impact of the organic-to-aqueous phase ratio (PO/PA1); (**e**) Effect of TZB presence and concentration in NPs; Data are presented as the mean ± SD from **three** independent experiments. **Abbreviations:** NPs. nanoparticles; PLGA. poly(lactic-co-glycolic acid); TZB. trastuzumab; SD. standard deviation; PO. organic phase; PA1. internal aqueous phase 1; PVA. polyvinyl alcohol; P188. poloxamer 188; DLS. dynamic light scattering.

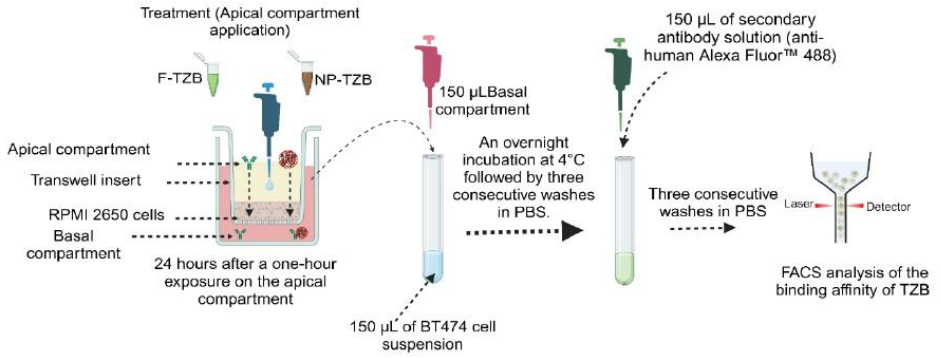



**Figure S9.** Protocol for Evaluating TZB Functionality after Crossing the RPMI 2650 Epithelial Barrier. The basal compartment medium, collected 24 hours after treatment in the apical compartment, was added to a suspension of 300,000 cells. After overnight incubation, the cells were washed three times with PBS buffer before adding the fluorescent secondary anti-human antibody conjugated to Alexa Fluor™ 488. Four hours later, the cells were washed three more times, fixed, and analyzed by flow cytometry to measure mean fluorescence intensity (MFI).

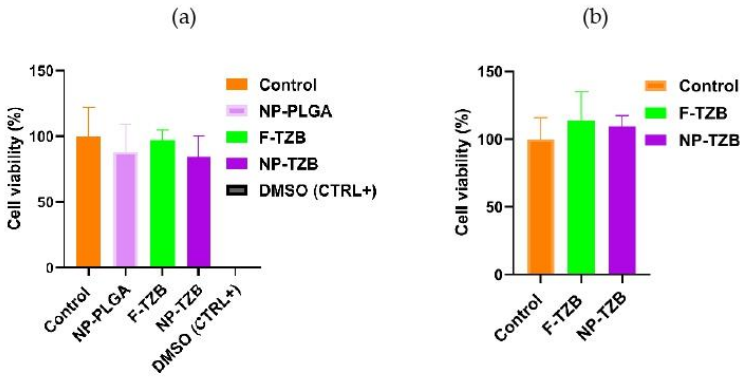



**Figure S10.** Assessment of cytotoxicity on central nervous system (CNS)-related cells after 1-hour exposure of 190 Nm TZB. Cell viability was evaluated using the MTT assay. Rat astrocyte cells and rat brain endothelial cells (blood–brain barrier model) were seeded in 96-well plates at a density of 3,000 cells per well. Once confluence was reached, cells were exposed to the tested formulations for 1 hour. After exposure, the treatment solutions were removed, and MTT solution (0.5 mg/mL) was added and incubated under standard culture conditions for 3 hours. Formazan crystals were subsequently solubilized using DMSO, and absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer. **(a)** Viability of rat astrocyte cells. **(b)** Viability of rat brain endothelial cells. Experiments were performed in quintuplicate (n=5) for astrocyte cells and n=3 for endothelial cells.