

Importance de la barrière hémato-encéphalique en pharmacie

Nous savons maintenant que la BHE est beaucoup plus qu'une simple barrière physique, mais bien une unité fonctionnelle dont toutes les composantes sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie cérébrale (Zhao et al. 2015). Par sa nature restrictive et son implication dans le maintien de l'homéostasie cérébrale, la BHE joue un rôle d'une grande importance dans le développement de nouveaux traitements pour les pathologies du SNC (Pardridge 2007b, Pardridge 2012). Tout d'abord, l'industrie pharmaceutique peine toujours à développer des molécules pouvant traverser la BHE, limitant ainsi la mise en marché de nouveaux médicaments pour les maladies neurologiques (Pardridge 2003, Pardridge 2005, Pardridge 2007c). De plus, de petites altérations au niveau de différentes composantes de la BHE pouvant sembler sans conséquence, peuvent pourtant mener à une dysfonction neuronale et à un processus de neurodégénérescence (Förster 2008, VanGilder et al. 2011).

Maladies impliquant une dysfonction de la barrière hémato-encéphalique

De plus en plus de recherches s'intéressent à l'implication de la BHE dans le développement, l'aggravation ou le maintien de nombreuses pathologies du SNC. Puisque la BHE contrôle l'apport en énergie, en oxygène et tant d'autres composants essentiels aux fonctions cérébrales, son rôle vital dans la santé du cerveau n'est pas surprenant. Des études ont révélé un nombre grandissant de maladies impliquant une dysfonction de la BHE (Abbott et al. 2010). Parmi ces maladies, on retrouve la sclérose en plaques (SP) (Correale et al. 2007), l'ischémie cérébrale (Kassner et al. 2015), la maladie d'Alzheimer (MA) (Zlokovic 2008b, Bell et al. 2009), la maladie de Parkinson (MP) (Zlokovic 2008a), l'épilepsie (Remy et al. 2005) et les tumeurs cérébrales (Bronger et al. 2005). Les pathologies vasculaires dans plusieurs maladies affectant le SNC peuvent impliquer des altérations au sein d'un ou de plusieurs composants de l'UNV. On retrouve parmi ces perturbations une diminution de l'expression des protéines des jonctions serrées, une augmentation de la perméabilité de la BHE, une perturbation dans l'activité des systèmes de transport, un problème de clairance, une diminution du nombre de péricytes, une perte ou une dysfonction des astrocytes ainsi qu'une altération de la membrane basale (Förster 2008, Rosenberg 2012, Obermeier et al. 2013). Ces altérations entraînent des conséquences graves favorisant ainsi un environnement cérébral propice à la neuroinflammation chronique et à la neurodégénération (Carvey et al. 2009). Certaines

pathologies comme la MA et la SP permettent de bien visualiser le cercle vicieux qui existe entre diverses altérations de la BHE et une insulte neuronale. Elles seront discutées dans la présente section.

La maladie d'Alzheimer

Au niveau symptomatique, la MA est caractérisée par un déclin cognitif progressif, touchant principalement la mémoire, les fonctions exécutives ainsi que la capacité des patients à effectuer des activités de la vie quotidienne (Tarawneh et al. 2012). L'étiologie de la MA est toujours inconnue. D'un point de vue neuropathologique, la MA est classiquement caractérisée par la présence d'une pathologie amyloïde extracellulaire, d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires (protéine Tau) ainsi que d'une perte neuronale associée à un déficit synaptique (Querfurth et al. 2010). Cependant, plusieurs maladies associées à des problèmes vasculaires tels que le diabète, l'hypertension et l'hypercholestérolémie peuvent aussi augmenter les risques de développer la MA (Kalaria et al. 2012). On retrouve aussi dans la MA de nombreuses altérations neurovasculaires et présentement plusieurs études suggèrent que la MA aurait une origine neurovasculaire (Zlokovic 2002, Bell et al. 2009, Kalaria et al. 2012) (Figure 6). C'est-à-dire que les perturbations observées sur les CECCs dans la MA pourraient être la cause de la maladie. Plusieurs anomalies vasculaires ont été observées chez les patients atteints de la MA et dans des modèles animaux et seront décrites dans les prochaines sections de cette thèse.

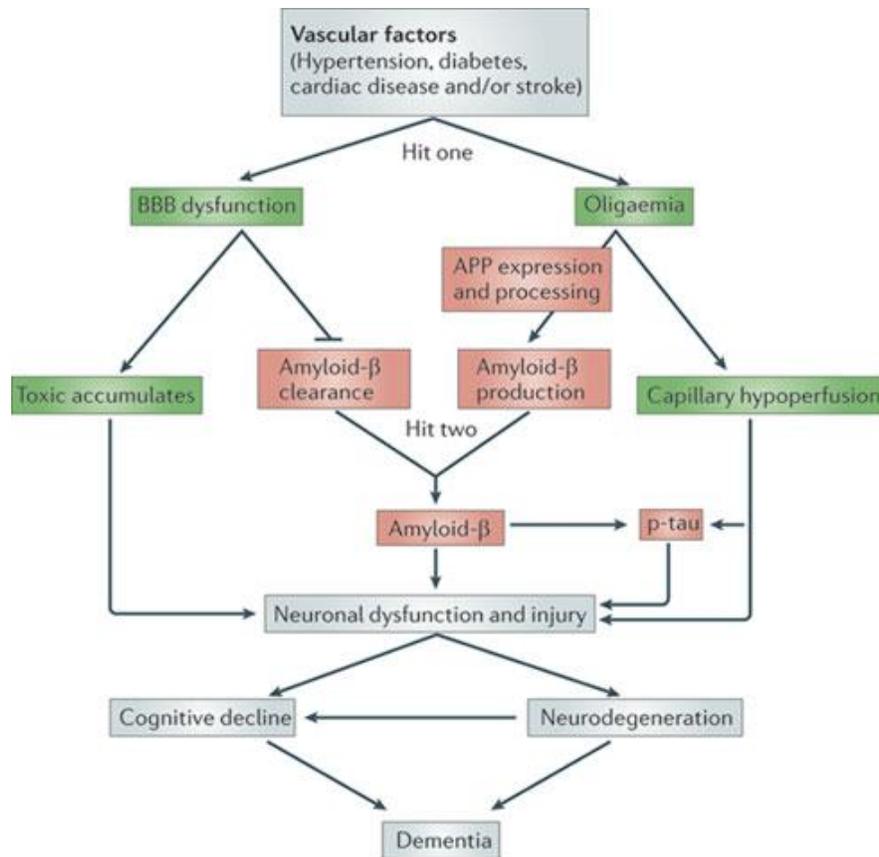


Figure 6: Mécanisme d'action des insultes vasculaires sur le développement de la maladie d'Alzheimer.

Tiré de Zlokovic 2011.

Altération de la clairance du peptide Aβ

La MA est caractérisée par l'accumulation du peptide Aβ (Glennner 1989). Cette accumulation pathologique du peptide était l'origine perçue comme une anomalie de la production d'Aβ. Cependant, plusieurs études suggèrent maintenant qu'un problème de clairance du peptide pourrait favoriser l'accumulation cérébrale et vasculaire d'Aβ (Shibata et al. 2000, Bell et al. 2007, Tarasoff-Conway et al. 2015) (Figure 7).

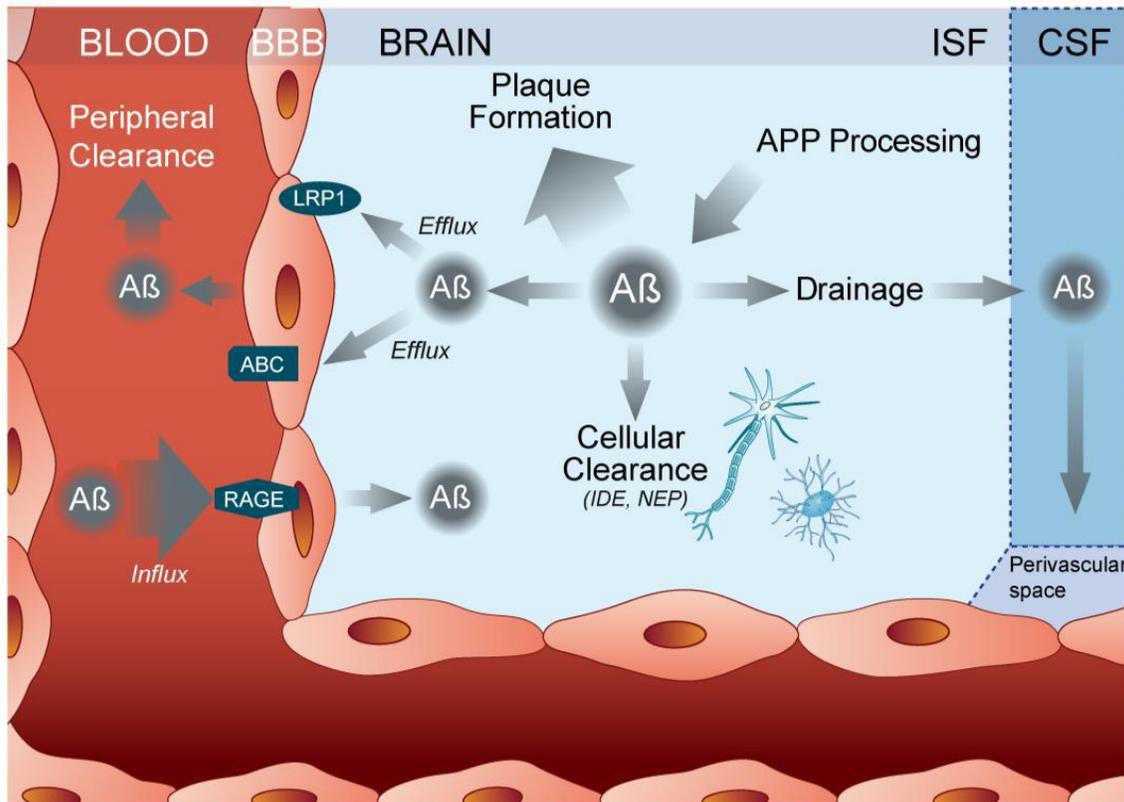


Figure 7: Les mécanismes de clairance du peptide A β .

Les mécanismes de clairance peuvent être divisés en quatre catégories. 1. La dégradation enzymatique et cellulaire ; 2. Le drainage périvasculaire ; 3. Le transport via la barrière hémato-encéphalique ; 4. La dégradation et la séquestration en périphérie. Adaptée de Vandal et al. 2015.

En effet, il a été démontré par Bateman et collaborateurs que 25% de la clairance d'A β proviendrait d'un transport direct du cerveau vers le sang via la BHE (Bateman et al. 2006, Roberts et al. 2014). Plusieurs transporteurs présents sur les CECCs seraient impliqués dans le transport du peptide A β . RAGE (*receptor for advanced glycation end-products*) est un transporteur d'influx du sang vers le cerveau important impliqué dans le transport de l'A β (Deane et al. 2004b). Bien que ce transporteur est en condition normale faiblement exprimé sur les CECCs, des études ont démontré une augmentation de son expression dans la MA ainsi que dans certains modèles animaux transgéniques de la maladie (Du Yan et al. 1996, Deane et al. 2004b, Donahue et al. 2006). L'accumulation des ligands de RAGE, dont l'A β , stimulerait l'expression du récepteur engendrant ainsi une importante accumulation d'A β au cerveau (Zlokovic 2008b). De plus, l'interaction A β /RAGE serait aussi responsable d'une activation endothéliale de la voie NF-kB engendrant la sécrétion de

facteurs proinflammatoires (Ott et al. 2014, Tobon-Velasco et al. 2014), l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion cellulaire (Fukami et al. 2014) et la production d'ET-1, un puissant vasoconstricteur (Gray et al. 2014).

Inversement, LRP-1 est un récepteur jouant un rôle majeur dans la clairance d'A β autant au niveau de la BHE (Shibata et al. 2000, Donahue et al. 2006, Ramanathan et al. 2015) qu'en périphérie (Tamaki et al. 2006). On estime que chez l'humain la forme soluble de LRP-1 (LRP-1s) peut lier jusqu'à 90% de l'A β présent dans le plasma (Sagare et al. 2007). Cette interaction pourrait donc séquestrer l'A β dans le plasma et favoriser sa clairance périphérique par le foie (Sagare et al. 2007). Par contre, chez certains patients souffrant de la MA associée à une forte accumulation vasculaire d'A β , une diminution de l'expression du récepteur a été observée, limitant ainsi l'efflux d'A β à l'extérieur du cerveau (Shibata et al. 2000, Deane et al. 2004a, Donahue et al. 2006). De plus, la liaison entre A β et LRP-1s serait altérée dans la MA (Sagare et al. 2012). Cette altération pourrait limiter la clairance d'A β par le foie, ce qui causerait une augmentation d'A β dans le sang et favoriserait l'accumulation du peptide pathologique au cerveau (Deane et al. 2004a).

Réduction du débit sanguin cérébral et déficit énergétique

La régulation du débit sanguin cérébral (DSC) est essentielle au maintien de l'homéostasie. Une diminution des fonctions cérébrovasculaires et un découplage entre le DSC et le métabolisme du cerveau ont été rapportés chez les patients atteints de la MA (de la Torre 2004, Zlokovic 2008a). En effet, des études d'imagerie par résonance magnétique (IRM) et par tomographie par émission de positrons (TEP) ont observé une diminution significative du DSC au repos ainsi qu'une hypoperfusion cérébrale chez les patients atteints de la MA (Costa et al. 1988, Montaldi et al. 1990, Johnson et al. 2006). De plus, une étude d'IRM fonctionnelle utilisant le signal du *blood-oxygen-level-dependent* (BOLD) comme mesure a rapporté un délai de la réponse du DSC chez des patients souffrant d'un trouble cognitif léger (Rombouts et al. 2005). Selon cette étude, ce délai serait davantage prononcé chez les patients atteints de la MA (Rombouts et al. 2005). Ces résultats suggèrent que la diminution du DSC apparaîtrait dans les stades précoces de la MA.

La diminution du DSC serait aussi reliée à une importante altération du métabolisme du glucose cérébral (Hoyer et al. 1991, Fukuyama et al. 1994, Piert et al. 1996, Winkler et al. 2011, Ding et al.

2013). Des études d'imagerie par TEP ont démontré une diminution du métabolisme du glucose dans plusieurs régions du cerveau telles que le cortex et l'hippocampe chez des patients souffrant d'un déficit cognitif léger bien avant l'apparition de la MA (Jagust et al. 1991, Piert et al. 1996, Minoshima et al. 1997, Hunt et al. 2007). Suite à l'apparition des déficits cognitifs, plusieurs études ont démontré une corrélation entre le déficit en glucose et la sévérité des symptômes cognitifs de la MA (Mosconi 2005, Cerami et al. 2015). De plus, des études ont aussi rapporté une diminution des niveaux de GLUT-1 sur les CECCs dans l'hippocampe et le cortex cérébral des patients atteints de la MA (Kalaria et al. 1989, Horwood et al. 1994). Une étude effectuée chez la souris 3xTg-AD a mis en évidence une association entre la réduction du passage du glucose au cerveau et les niveaux de GLUT-1 sur les CECCs chez les souris transgéniques en comparaison avec les animaux témoins (Do et al. 2014). Ces résultats suggèrent donc que l'hypométabolisme cérébral précéderait la neurodégénérescence ainsi que l'atrophie cérébrale.

Changements morphologiques de la vascularisation cérébrale

On observe plusieurs changements morphologiques de la vascularisation cérébrale chez les patients atteints de la MA (Vinters et al. 1994). Une diminution de la densité de la microvascularisation cérébrale en plus d'une atrophie des capillaires et des artéioles a été rapportée (Bailey et al. 2004). Au niveau de l'endothélium, on observe une augmentation de la pinocytose et une diminution de la densité des mitochondries. Des études ont aussi rapporté une diminution des marqueurs des CECCs CD34 et CD31 suggérant une dégénération de l'endothélium (Kalaria et al. 1995a). Par ailleurs, une étude aurait associé une faible expression du gène MEOX2 dans les CECCs à certains phénotypes endothéliaux pathologiques observés dans la MA comme la diminution de la clairance d'A β et l'atrophie vasculaire (Wu et al. 2005b). De plus, on retrouve chez plus de 80% des cas de la MA des dépôts vasculaires d'A β . Cette pathologie, appelée angiopathie amyloïde cérébrale (AAC), peut toucher tous les types de vaisseaux présents dans le cerveau (Jellinger 2010). Les vaisseaux affectés par cette pathologie montrent fréquemment des signes d'atrophies et on rapporte chez 30% des cas des microhémorragies cérébrales (Cordonnier 2011, Viswanathan et al. 2011).

Plusieurs études ont aussi rapporté une augmentation des teneurs en collagène IV, protéoglycans et lamine causant un épaissement de la LB (Kalaria et al. 1995b, Verbeek et al. 1999, Berzin et al. 2000, Farkas et al. 2001, Bailey et al. 2004). Cet épaissement de la LB a aussi été rapporté chez

la souris 3xTg-AD entraînant une diminution du volume vasculaire cérébral (Bourasset et al. 2009). De plus, des études post mortem ont aussi identifié la présence de la métalloprotéinase MMP-9 dans les cerveaux des patients Alzheimer (Asahina et al. 2001). L'activation de MMP-9 peut ainsi entraîner des dommages au sein de la BHE et potentiellement mener à la formation de microhémorragies cérébrales (Fukuda et al. 2004, Yang et al. 2007, Rosenberg 2009).

La sclérose en plaques

La SP est une maladie neuro-immune, progressive, caractérisée par des lésions de la gaine de myéline engendrant chez les individus souffrant de cette maladie des troubles variés (visions, motricité, sensibilité, fatigue, etc.) (Noseworthy et al. 2000, Sospedra et al. 2005, Pinheiro et al. 2016). On retrouve au niveau de ces lésions cérébrales, une infiltration anormale de cellules immunitaires, stimulant ainsi une réponse auto-immune (Lassmann et al. 1983, Engelhardt et al. 1997). Dans la SP, une altération de la BHE pourrait jouer un rôle important dans l'apparition et dans la progression de la maladie (Fabis et al. 2007, Morgan et al. 2007, Weiss et al. 2009b). Plusieurs études menées dans un modèle murin de la SP ont d'ailleurs démontré une corrélation entre la sévérité des symptômes et le degré de perturbation de l'intégrité de la BHE (Kirk et al. 2003, Minagar et al. 2003).

Bien qu'il soit difficile de déterminer si l'altération de la BHE est à l'origine de l'infiltration massive des cellules immunitaires ou l'inverse, il est clair que les fonctions de la BHE sont perturbées durant la formation des lésions (Larochelle et al. 2011, Daneman et al. 2015). En effet, on observe au niveau de ces lésions dites actives une altération de l'expression de certaines protéines des jonctions serrées, causant ainsi une augmentation de la perméabilité de la BHE (Morgan et al. 2007, Alvarez et al. 2011a). En plus d'une augmentation de la perméabilité qui facilite l'infiltration des cellules immunitaires circulantes, on observe aussi une augmentation de l'expression de nombreuses molécules d'adhésions leucocytaires comme I-CAM, V-CAM et E-sélectine dans les cerveaux de patients souffrant de la SP (Sobel et al. 1990, Bö et al. 1996).

Défi pour les sciences pharmaceutiques

Bien que de nombreuses cibles thérapeutiques aient été identifiées autant au niveau cérébral qu'endothélial, la BHE est l'obstacle principal ralentissant considérablement le développement de médicaments pour traiter les pathologies du SNC (Alam et al. 2010, Patel et al. 2013). Malgré le fait qu'il existe des traitements disponibles pour traiter certaines pathologies neurologiques (dépression, schizophrénie, épilepsie), très peu, voire aucune maladie neurodégénérative ne sont pour l'instant traitée convenablement par les médicaments actuellement sur le marché (Pardridge 2007c). Présentement, on estime qu'environ 98% des petites molécules thérapeutiques ne peuvent traverser la BHE (Pardridge 2005, Pardridge 2007a, Zlokovic 2008b). Pour les produits biopharmaceutiques, le problème est particulièrement grave. En effet, les maladies périphériques bénéficient d'une multitude de médicaments à base d'anticorps monoclonaux ou de protéines recombinantes, tandis que pratiquement aucun de ces produits n'est disponible sur le marché pour traiter les maladies du SNC, car ils ne traversent pas la BHE (Pardridge 2005, Pardridge 2007a). L'exception étant le médicament Aducanumab dans la MA (Ferrero et al. 2016, Sevigny et al. 2016). De plus, très peu de maladies du SNC répondent bien aux traitements actuels basés sur l'utilisation de petites molécules (Figure 8). Le problème que représente la BHE dans le développement de nouveaux médicaments est tel que plusieurs équipes de recherche se consacrent maintenant au développement de nouvelles stratégies pour franchir la BHE. Néanmoins, compte tenu de l'étroite relation qui existe entre les composantes de la BHE, une meilleure connaissance de la BHE et des mécanismes de ciblage thérapeutique ouvre également la porte à de nouvelles possibilités pour améliorer la santé cérébrale.

Les défis de l'industrie pharmaceutique pour le développement de médicaments pour les maladies du SNC:

La majorité des maladies du SNC ne sont toujours pas traitées efficacement par les médicaments sur le marché

Maladies du SNC efficacement traitées à l'aide de petites molécules:	Maladies du SNC réfractaires aux traitements basés sur des petites molécules:
Dépression	Maladie d'Alzheimer
Schizophrénie	Maladie d'Huntington
Maladie de Parkinson*	Sclérose latérale amyotrophique
Douleur chronique	Sclérose en plaque
Épilepsie	Atteinte cérébrale du SIDA
	Cancer du cerveau
	Accident vasculaire cérébral
	Traumatisme cérébral
	Lésion de la moelle épinière
	Autisme
	Maladies de storage lysosomal
	Syndrome du X fragile
	Ataxies héréditaires
	Cécité

Une revue de la base de données du «Comprehensive Medicinal Chemistry» démontre que sur plus de 7000 médicaments de petit poids moléculaire seulement 5% sont efficaces pour traiter le SNC et ces médicaments ciblent principalement quatre maladies: la dépression, la schizophrénie, la douleur chronique et l'épilepsie. Il existe très peu de molécules thérapeutiques pour la majorité des maladies du SNC à l'exception de l'utilisation de la levodopa dans la maladie de Parkinson et des cytokines dans la sclérose en plaque

Figure 8: Les défis de l'industrie pharmaceutique pour le développement de médicaments pour les maladies du système nerveux central.

Adaptée de Partridge 2005

L'approche par chimie médicinale

Il est connu que les petites molécules hautement lipophiles diffusent aisément à travers les membranes des CECCS du sang vers le cerveau. Une approche par chimie médicinale permet d'augmenter la pénétration des médicaments au cerveau en augmentant la lipophilicité des molécules hydrophiles en bloquant les groupements capables de faire des ponts hydrogènes, tout en

ne modifiant pas la liaison au site moléculaire ciblé (Abbott et al. 1996, Pardridge 2007b). Malgré la grande simplicité rationnelle derrière cette technique, à ce jour cette approche peine toujours à augmenter considérablement la biodisponibilité des molécules thérapeutiques au cerveau. En effet, augmenter le caractère lipophile d'une molécule favorise sa pénétration à travers la barrière endothéliale de la BHE, mais augmente aussi son taux de pénétration à travers toutes les membranes biologiques de l'organisme, diluant ainsi le médicament à travers le corps entier (Pardridge 1998). Il a été estimé par Pardridge qu'une hausse de la lipophilicité pouvait réduire si rapidement les concentrations circulantes qu'ultimement la biodisponibilité cérébrale n'était pas augmentée (Pardridge, 2007 #531, Gabathuler 2010, Lu et al. 2014, Crawford et al. 2016). De plus, un autre facteur influençant la pénétration des molécules au cerveau est le poids moléculaire. Inévitablement, l'ajout de groupement lipophile va augmenter considérablement le poids moléculaire du médicament et donc ainsi limiter sa capacité à franchir la BHE (Pardridge 2007a).

Approches invasives

Il est possible de contourner la BHE pour acheminer les médicaments au cerveau avec des stratégies qui sont qualifiées comme étant invasives. Ces approches sont dites invasives, car elles nécessitent une intervention chirurgicale ou une perturbation de la BHE. Certaines de ces approches ont montré une bonne efficacité en études cliniques, mais il est important de noter que ces approches ne sont pas sans risque et sans inconvénient (Fortin et al. 1999, Doolittle et al. 2000, Bellavance et al. 2008).

Il est possible de contourner la BHE par des approches chirurgicales (injection transcrânienne, cérébroventriculaire) (Pardridge 2007b) ou en perturbant de manière temporaire l'intégrité de la BHE (choc osmotique, bradykinine, ultrasons) (Bellavance et al. 2008, Timbie et al. 2015, Van Tellingen et al. 2015). Pour toutes ces techniques, l'intervention doit être effectuée par un spécialiste et est difficilement envisageable dans le cadre du traitement chronique d'une maladie (Miller 2002). Un des problèmes majeurs de l'approche chirurgicale est le faible taux de diffusion des composés dans le parenchyme cérébral suite à l'injection (Krewson et al. 1995, Fung et al. 1996, Gaillard et al. 2005b). On estime que la concentration d'une molécule injectée directement dans le cerveau va décroître de 90% sur seulement 500 μm (Dykstra et al. 1993, Mak et al. 1995, Fung et al. 1996, Thorne et al. 2001, Thorne et al. 2006, Wolak et al. 2015). Tandis que pour l'augmentation de la perméabilité de la

BHE, la principale préoccupation est le potentiel neurotoxique de l'approche. En effet, l'ouverture de la BHE permet grandement de favoriser la pénétration au cerveau d'un médicament, mais est non sélective et permet aussi l'entrée de substances potentiellement neurotoxiques pouvant causer des changements neuropathologiques chroniques (Salahuddin et al. 1988, Nadal et al. 1995, Miller 2002).

Ciblage thérapeutique

Les médicaments présentement offerts sur le marché pour soigner les maladies neurodégénératives sont malheureusement souvent très peu efficaces et aucun n'est curatif (Pardridge 2001). De plus, les méthodes pharmacologiques ou invasives pour augmenter la pénétration au cerveau sont soit inefficaces ou inappropriées dans le cadre d'un traitement chronique. Par contre, la vascularisation cérébrale possède un grand nombre de transporteurs spécifiques et il est possible de cibler de manière non invasive ces transporteurs avec un ligand (Gaillard et al. 2005b, Pardridge 2005, Georgieva et al. 2014, Lajoie et al. 2015, Pardridge 2015b).

Chez l'humain, on estime que la longueur totale de la vascularisation cérébrale à près de 650 km (Pardridge 2005, Zlokovic 2008b). Avec une aussi grande surface de contact entre le sang et le cerveau, on estime que pratiquement chaque neurone est perfusé par son propre capillaire (Pardridge 2005, Zlokovic 2005, Zlokovic 2008b). Cibler directement les CECCs permettrait donc de faire diffuser un composé thérapeutique à travers tout le cerveau sans avoir à perturber l'intégrité de la BHE (Pardridge 2002, Gaillard et al. 2005b).

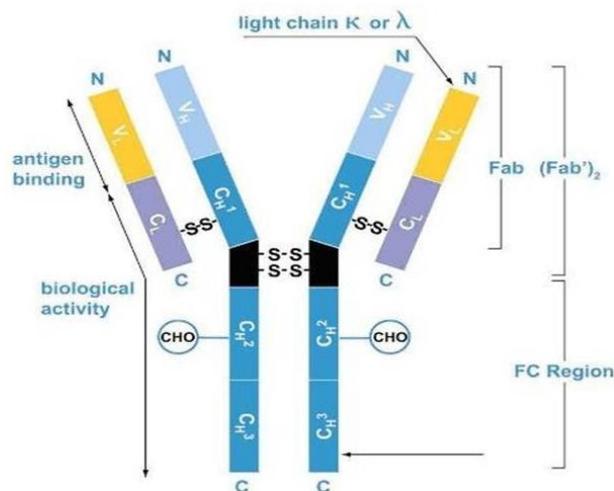
Une stratégie employée pour le ciblage thérapeutique vise à cibler directement un système de TMR présent en grande quantité sur les CECCs (Gaillard et al. 2005b, Pardridge 2006). Pour se faire, on utilise une molécule ciblant spécifiquement un récepteur conjugué à un composé thérapeutique (Pardridge 2001, Pardridge 2006, Neuwelt et al. 2008). Généralement, les molécules de ciblage ou vecteurs typiquement utilisés sont soit les différents ligands endogènes des récepteurs ciblés, des peptides ou anticorps monoclonaux conçus pour cibler et être internalisés par TMR (Pardridge et al. 1991, Pardridge 2012, Lajoie et al. 2015).

L'utilisation de ligands endogènes pour le ciblage thérapeutique est problématique, car leur concentration plasmatique est souvent très élevée et demande donc l'administration d'une quantité exagérée de vecteurs pour déplacer le ligand naturel (Gaillard et al. 2005b, Jones et al. 2007, Pardridge 2012). De plus, spécifiquement dans le cadre du ciblage du récepteur de l'insuline, l'utilisation de l'insuline comme vecteur peut causer de l'hypoglycémie et donc engendrer de graves conséquences pour le patient (Bickel et al. 2001).

Anticorps monoclonaux

Plusieurs peptides et anticorps monoclonaux (AcM) ciblant des transporteurs situés sur les CECCs ont été développés et utilisés pour le ciblage thérapeutique cérébral (Georgieva et al. 2014). Ces vecteurs protéiques se lient habituellement à des épitopes différents de ceux ciblés par les ligands naturels afin de limiter la compétition pour le site de liaison (Gaillard et al. 2005b, Pardridge 2007b). De plus, les vecteurs offrent la possibilité de cibler une région du domaine extracellulaire du récepteur pouvant déclencher l'internalisation de celui-ci (Pardridge 2007b). Les AcMs sont très souvent utilisés sous leur forme « complète », mais certains fragments de l'anticorps (Fab, F(ab')₂, etc.) peuvent aussi être employés comme vecteurs. La structure de l'AcM est représentée dans la Figure 9.

Basic Structure of an Antibody



www.technologyinscience.blogspot.com

Figure 9: Représentation schématique de la structure de base d'un anticorps monoclonal

Anticorps ciblant le récepteur de la transferrine

La grande abondance du RTf au niveau des CECCs fait de celui-ci une cible de choix pour le ciblage thérapeutique au cerveau. D'ailleurs, le RTf est le système de TMR le plus étudié et le mieux caractérisé pour le transport des médicaments au cerveau (Friden et al. 1991, Moos et al. 2001, Yu et al. 2011, Bien-Ly et al. 2014). Une quantité impressionnante d'études soulignent le potentiel thérapeutique de l'utilisation d'AcM contre le RTf pour le ciblage thérapeutique (Friden et al. 1991, Pardridge et al. 1991, Zhang et al. 2003b, Boado et al. 2009d, Yu et al. 2011). Cependant, malgré plusieurs résultats encourageants chez l'animal, encore aujourd'hui aucun AcM ciblant le TfR n'a réussi à aboutir en étude clinique pour le traitement de maladies du SNC.

Anticorps classiques

Les AcM utilisés dans le cadre du ciblage thérapeutique sont habituellement spécifiques à une espèce, car les sites de liaisons ciblés ne sont souvent pas conservés d'une espèce à l'autre (Shi et al. 2001a, Zhang et al. 2003b, Boado et al. 2011b). Plusieurs AcMs ont été conçus pour cibler le RTf et seront discutés dans la présente section de la thèse.

Le clone OX26, est un anticorps de souris conçu pour cibler le TfR chez le rat (Friden et al. 1991) (Friden et al. 1991b), tandis que les clones Ri7.217 (Lesley et al. 1984a) et 8D3 (Kissel et al. 1998) sont des AcMs générés chez le rat pour cibler le RTf de la souris. Encore à ce jour, comme pour la Tf, leur mécanisme de transport intracellulaire à travers la BHE est controversé (Friden et al. 1991, Broadwell et al. 1996, Moos et al. 2001). Les résultats des premières études avec le vecteur OX26 ont été interprétés comme des preuves que l'AcM était capable de pénétrer au niveau du parenchyme cérébral (Pardridge et al. 1991, Bickel et al. 1994). En 1991, Pardridge et collaborateurs ont publié une étude démontrant une hausse des concentrations totales mesurées sur un homogénat de cerveau du vecteur OX26 suite à l'injection intraveineuse de l'AcM radiomarqué (Pardridge et al. 1991). Cette étude a été suivie d'une démonstration de la distribution subcellulaire de l'AcM OX26 couplé à des billes d'or (Bickel et al. 1994). Dans cette étude, les auteurs ont observé la présence de trois particules d'or couplées au vecteur OX26 à l'extérieur de la membrane abluminal de la cellule

endothéliale et interprété ces résultats comme une preuve de transcytose de l'AcM. Par la suite, le groupe de recherche dirigé par Pardridge a aussi publié de nombreuses études de pharmacocinétique afin de quantifier l'accumulation cérébrale des AcMs ciblant le RTf chez la souris (Ri7, 8D3) (Lee et al. 2000, Boado et al. 2009c, Zhou et al. 2010a, Zhou et al. 2010b, Zhou et al. 2011c)

et le rat (OX26) (Saito et al. 1995, Wu et al. 1996, Li et al. 1999). Ces études, basées sur des mesures de radioactivité sur des homogénats de cerveau, ont permis de démontrer qu'entre 2-3 % de la dose injectée de l'AcM s'accumulait au cerveau et que l'utilisation d'un AcM ciblant le RTf permettait d'augmenter de manière significative le volume de distribution cérébral en comparaison avec un AcM contrôle. Par contre, d'autres études qui ont directement cherché à déterminer le transport des vecteurs ciblant le RTf, ont au contraire démontré que le vecteur était seulement internalisé au sein de CECCs (Moos et al. 2001, Gosk et al. 2004, van Rooy et al. 2011, Yu et al. 2011, Manich et al. 2013, Bien-Ly et al. 2014, Niewoehner et al. 2014, Cabezón et al. 2015, Villaseñor et al. 2016). En effet, ces études démontrent plutôt un très faible taux de transcytose ou une même une restriction complète au niveau des capillaires cérébraux, selon certaines méthodes d'analyses (Moos et al. 2001, Gosk et al. 2004, Cabezón et al. 2015). Selon une hypothèse proposée par Moos et Morgan, cette accumulation au niveau de CECCs serait due à une trop grande affinité entre l'AcM et son récepteur et que seule une très faible quantité d'AcM serait acheminée dans le parenchyme cérébral de manière non spécifique (Moos et al. 2001). Les recherches du groupe de Ryan Watts chez Genentech sur l'impact de l'affinité des AcMs sur leur passage à travers la BHE via le RTf cherchent à confirmer cette hypothèse (Yu et al. 2011, Bien-Ly et al. 2014, Yu et al. 2014, Zuchero et al. 2016).

Bien qu'il existe un doute quant à la transcytose complète des AcMs ciblant le RTf, plusieurs études ont rapporté des actions centrales d'agents thérapeutiques couplées à de tels vecteurs (Zhang et al. 2003b, Pardridge 2006, Xia et al. 2007, Zhang et al. 2008, Yu et al. 2011, Yu et al. 2013, Niewoehner et al. 2014, Yu et al. 2014). Cependant, les conclusions tirées de ces études reposent surtout sur des preuves indirectes, il reste donc difficile de bien cerner les mécanismes d'action de ces approches. Tout d'abord, l'équipe de recherche de Pardridge a réussi à démontrer que le volume de distribution au cerveau des AcMs ciblant le RTf était similaire à ceux du diazépam et de la morphine, de petites molécules lipidiques traversant facilement la BHE (Greenblatt et al. 1990, Wu et al. 1997, Lee et al.

2000, Boado et al. 2009c). Par la suite, plusieurs études ont observé des effets thérapeutiques dans plusieurs modèles animaux (Shin et al. 1995, Huwyler et al. 1996, Wu et al. 1996, Shi et al. 2001a, Zhang et al. 2003b, Fu et al. 2010, Boado et al. 2011b, Zhou et al. 2011a, Zhou et al. 2011b, Pardridge et al. 2012). Ces études rapportent une augmentation de 300% de l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH) suite à l'injection d'un vecteur de fusion conjuguant un AcM ciblant le RTf dans un modèle de la maladie de Parkinson (Zhang et al. 2003b). De plus, des effets thérapeutiques, traduits par une diminution de 40% des taux d'A β au cerveau, ont aussi été observés dans un modèle animal de la MA (Zhou et al. 2011a, Zhou et al. 2011b).

Modification de l'affinité et de l'avidité

Plusieurs études axées spécifiquement sur le transport et l'internalisation des AcMs OX26 et Ri7 ont démontré que ces AcMs étaient fortement internalisés par les CECCs, mais que seule une très faible proportion des vecteurs pénétrait réellement au cerveau (Moos et al. 2001, Gosk et al. 2004, Manich et al. 2013, Cabezón et al. 2015). Ce faible taux de pénétration dans le parenchyme cérébral pourrait possiblement mettre en doute l'efficacité des traitements (Bien-Ly et al. 2014, Niewoehner et al. 2014).

Il a été postulé que cette accumulation massive au sein des CECCs serait due principalement à deux facteurs. Tout d'abord, une trop forte affinité entre l'AcM et son récepteur limiterait la dissociation des AcMs et donc la transcytose (Moos et al. 2001, Yu et al. 2011, Zuchero et al. 2016). De plus, la force de la liaison entre l'AcM et le récepteur pourrait influencer son transport intracellulaire (Bien-Ly et al. 2014, Niewoehner et al. 2014).

Basées sur ces deux hypothèses, de récentes études ont démontré qu'en modifiant par génie génétique les propriétés de liaison des AcM avec le RTf (affinité ou l'avidité), il était possible d'augmenter le taux de transcytose au cerveau (Yu et al. 2011, Bien-Ly et al. 2014, Niewoehner et al. 2014, Zuchero et al. 2016). Une première étude menée chez la souris avec quatre AcM de différentes affinités ($K_D = 1 - 111$ nM) a démontré une rétention accrue au cerveau de l'AcM ayant la plus faible affinité, appelé TfR^D, 24 h après l'injection d'une dose dite thérapeutique (20-50 mg/kg) (Yu et al. 2011). De plus, cette étude a aussi suggéré que le clone de faible affinité pouvait avoir un potentiel thérapeutique en plus de propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques

avantageuses. L'injection d'anticorps bispécifiques ciblant le RTf et l'enzyme BACE1 a mené à une réduction de près de 40% des niveaux d'A β dans le cerveau et le plasma de souris C57Bl/6 (Yu et al. 2011). De plus, une étude subséquente par la même équipe s'intéressant davantage au mécanisme intracellulaire suite à l'internalisation des AcMs de faible affinité en comparaison avec les AcMs de forte affinité suggère que les AcM de fortes affinités seraient plus rapidement dégradés par la machinerie lysosomale (Bien-Ly et al. 2014).

En 2014, une autre publication s'est penchée sur l'influence de l'avidité sur le processus de transcytose (Niewoehner et al. 2014). Dans cette étude, des fragments Fab d'un AcM ciblant le RTf ont été fusionnés à un anticorps anti-A β (mAb31) pour créer un AcM divalent (dFab, $K_D = \sim 5$ nM) et un AcM monovalent (sFab, $K_D = \sim 30$ nM) (Niewoehner et al. 2014). Les résultats de cette étude suggèrent par la visualisation d'un signal fluorescent diffus à l'extérieur des capillaires et la réduction de la taille des plaques amyloïdes dans un modèle de la MA que les AcMs monovalents pénétraient dans le parenchyme cérébral alors que les AcMs divalents s'internalisaient massivement dans les CECCs (Niewoehner et al. 2014). De plus, les études de ce groupe de recherche rapportent que les AcMs bivalents seraient davantage dirigés vers le lysosome (Niewoehner et al. 2014, Villaseñor et al. 2016).

Par contre, bien que la diminution de l'affinité et de l'avidité de l'anticorps augmenterait significativement la pénétration dans le parenchyme cérébral, la quantité nécessaire d'anticorps pour obtenir une rétention accrue au cerveau est très importante et pourrait engendrer des coûts énormes dans le cadre d'un traitement chronique chez l'humain (Lajoie et al. 2015). De plus, l'utilisation de fortes doses soulève un point critique face aux effets secondaires associés à une telle approche. Une étude soulevant des considérations importantes sur la sécurité de l'utilisation d'une forte dose d'AcM chez la souris a, par ailleurs, démontré que l'injection dite thérapeutique d'AcM pouvait engendrer une diminution du nombre de réticulocytes suite à l'activation du complément (Couch et al. 2013). Bien que cette étude ait conclu que cette approche était sécuritaire pour l'humain, car les quantités de réticulocytes en circulation sont négligeables (Couch et al. 2013), il sera essentiel dans le futur d'approfondir la question avant de faire le saut vers la clinique.

Anticorps ciblant le récepteur de l'insuline

L'anticorps 83-14 est un AcM de souris ciblant l'épitope exofacial de la sous-unité α du récepteur de l'insuline humain qui a été étudié chez le singe (Pardridge et al. 1995). En utilisant l'AcM 83-14, l'équipe de recherche de Pardridge a réussi à acheminer au cerveau des immunoliposomes contenant un plasmide d'expression codant pour la β -galactosidase et à visualiser l'expression de l'enzyme dans le cerveau chez le primate (Zhang et al. 2003c). Par ailleurs, une version humanisée de cet anticorps a été développée par la compagnie ArmaGen Technologies, nommée HIRMAb et est aussi très bien documentée (Coloma et al. 2000, Boado et al. 2007a, Pardridge et al. 2012).

La version humanisée HIRMAb a été largement étudiée dans le cadre d'enzymothérapie substitutive pour le traitement de certaines pathologies lysosomales, comme le syndrome de Hurler (Boado et al. 2008c, Lu et al. 2009, Boado et al. 2010d, Lu et al. 2011). En effet, ArmaGen Technologies, en fusionnant HIRMAb avec l'enzyme α -L-iduronidase (IDUA), a réussi à diminuer de 70% l'accumulation de glycosaminoglycan dans une culture de fibroblastes humains modélisant le syndrome de Hurler (Boado et al. 2008c, Lajoie et al. 2015). De plus, les études *in vivo* chez le singe ont démontré une accumulation de la dose injectée au cerveau du HIRMAb conjugué à l'enzyme iduronate 2 -sulfatase d'environ 0.8 % (Lu et al. 2011). Cette accumulation a par ailleurs permis d'augmenter de 10 fois l'activité enzymatique en comparaison avec les niveaux endogènes (Lu et al. 2011). Ces résultats de pharmacocinétique favorables ainsi que l'efficacité de l'enzyme recombinante ont permis à la compagnie ArmaGen Technologies de commencer une étude clinique avec leur produit rebaptisé AGT-181 pour le traitement du syndrome de Hurler (NCT02371226).

En parallèle, l'anticorps HIRMAb a aussi fait l'objet de plusieurs autres études précliniques. HIRMAb a été fusionné avec plusieurs molécules au potentiel thérapeutique comme un anticorps anti-A β (Boado et al. 2007b, Boado et al. 2010c), le GDNF (Boado et al. 2008a, Boado et al. 2009b), le TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) (Hui et al. 2009, Boado et al. 2010b), l'érythropoïétine (Boado et al. 2010a) et le paroxonase (Boado et al. 2008b, Boado et al. 2011a). Ces études chez le singe ont démontré une rétention au cerveau de la dose injectée avoisinant les 1% démontrant ainsi un profil pharmacocinétique semblable au vecteur AGT-181 (Boado et al. 2009a, Pardridge et al. 2012). Bien que toutes ces publications suggèrent une action thérapeutique importante de ces vecteurs,

aucune de ces protéines de fusions n'a fait l'objet d'études cliniques jusqu'à présent, à l'exception de l'AGT-181.

Anticorps à domaine unique de lama et autres fragments d'anticorps

L'avancement dans le domaine de la production et de l'ingénierie des anticorps a permis de développer une nouvelle classe de produits biopharmaceutiques beaucoup plus complexes, mais ayant beaucoup plus de spécificité que les petites molécules thérapeutiques classiques (Adams et al. 2005, Wu et al. 2005a). De nos jours, il est maintenant possible de modifier et de manipuler les AcMs afin d'améliorer les effets thérapeutiques, de limiter les effets indésirables ainsi que de réduire leurs tailles (Holliger et al. 2005). Ces fragments d'anticorps possèdent des propriétés pharmacocinétiques intéressantes. En effet, les petits fragments d'anticorps pénètrent plus facilement les tissus et l'absence de fragment Fc diminue considérablement la toxicité (Chowdhury et al. 1998). Par contre, leur petite taille engendre une clairance sanguine rapide et donc une exposition limitée à leur cible (Monnier et al. 2013). Néanmoins, ces fragments peuvent être manipulés de manière à créer des multimères (liaisons de 2, 3 ou 4 fragments) multivalents et peuvent aussi être multifonctionnels afin d'augmenter leur stabilité systémique, mais sans compromettre leur capacité de pénétration (Hudson 1998). De plus, les fragments générés peuvent facilement être conjugués à des cargos comme des composés thérapeutiques ou des nanoparticules (NPs) (Chari 1998, Chowdhury et al. 1998, Holliger et al. 2005, Tong et al. 2010).

FC5

FC5 est un fragment d'anticorps à domaine unique (sdAb) isolé d'une librairie de phages décorés avec des fragments sdAb de lama (Muruganandam et al. 2002). Ce fragment d'anticorps est composé seulement du domaine variable de la chaîne lourde (Muruganandam et al. 2002). Ce clone a spécifiquement été sélectionné pour sa capacité à se lier et à être internalisé par des cellules cérébrovasculaires humaines (Muruganandam et al. 2002). De plus, des études *in vivo* ont montré par détection immunologique la présence de l'anticorps dans les neurones (Farrington et al. 2014). Cette accumulation serait médiée par son interaction avec une (2,3)-sialoglycoprotéine identifiée comme étant Cdc50A (Muruganandam et al. 2002, Abulrob et al. 2005). FC5 a aussi été manipulé de manière à développer des clones monovalents et divalents avec un fragment Fc humain (~75 kDa)

(Haqqani et al. 2013). Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que ces complexes conservaient leur capacité à traverser la BHE et à s'accumuler au cerveau (Haqqani et al. 2012, Farrington et al. 2014). De plus, l'ajout du fragment Fc a permis la liaison d'un neuropeptide thérapeutique (dalargin) au complexe. L'injection systémique de ce complexe a démontré une efficacité analgésique accrue en comparaison avec un vecteur contrôle dans un modèle d'hyperalgésie thermique chez le rat (Farrington et al. 2014, Stanimirovic et al. 2014).

Fragments scFv

Comme pour les sdAbs, les scFvs (*single chain Fv fragments*) sont très souvent isolés à partir de banques d'anticorps produites par *phage display*, mais il est aussi possible de travailler avec des banques de scFv provenant de la levure (Shusta et al. 1998, Monnier et al. 2013). Les scFvs sont composés du domaine variable de la chaîne lourde et de la chaîne légère de l'AcM et malgré leur taille plus volumineuse que les sdAbs, ils possèdent relativement les mêmes propriétés pharmacocinétiques (Maynard et al. 2000).

L'équipe du Dr Shusta travaille à l'identification de nouveaux anticorps pouvant cibler la BHE (Wang et al. 2007, Jones et al. 2014, Zhang et al. 2014). En travaillant avec des banques d'anticorps provenant de la levure, son équipe a identifié un clone (scFvA) comme vecteur ciblant la BHE (Wang et al. 2007). Dans une étude complémentaire, scFvA a été modifié pour former un tétramère et cette étude a démontré que le multimère potentialisait l'internalisation *in vitro* tout en conservant ses propriétés de liaison aux CECCs *in vivo* (Zhang et al. 2014).

Les peptides/protéines

En plus des AcMs et des fragments d'anticorps, il est aussi possible d'utiliser des peptides ou des protéines pour traverser la BHE (Gaillard et al. 2005a, Gabathuler 2010, Lajoie et al. 2015). Ces molécules peuvent cibler spécifiquement un récepteur et utiliser un mécanisme de TMR ou vont, dans le cas de plusieurs peptides pénétrants, utiliser un mécanisme d'entrée moins spécifique comme la transcytose absorbative pour pénétrer la BHE (Jones et al. 2007, Georgieva et al. 2014, Lalatsa et al. 2014).

Protéines et peptides ciblant le récepteur LRP-1

Le récepteur LRP-1 est largement présent dans plusieurs tissus du SNC et est aussi surexprimé dans certaines tumeurs cérébrales comme le glioblastome (Moestrup et al. 1992, Wolf et al. 1992, Rebeck et al. 1993, Bu et al. 1994, Yamamoto et al. 1997). Plusieurs études s'intéressant au passage des macromolécules vers le cerveau ont suggéré que le récepteur LRP-1 serait impliqué dans la transcytose de plusieurs ligands/macromolécules au niveau de la BHE (Kounnas et al. 1995, Herz et al. 2001, Gabathuler 2010). De plus, la surexpression de ce récepteur dans le cancer du cerveau suscite un certain engouement pour le développement de traitement pour cette maladie. Jusqu'à présent, aucun anticorps n'a été développé pour le ciblage thérapeutique via LRP-1 (Lajoie et al. 2015). Par contre, plusieurs ligands (protéines et peptides) ont été étudiés pour le ciblage thérapeutique au cerveau et les principaux ligands utilisés seront discutés dans la présente section de la thèse (Gaillard et al. 2005b, Gabathuler 2010, Georgieva et al. 2014).

Mélanotransferrine/p97

L'engouement pour le récepteur LRP-1 pour le ciblage thérapeutique cérébral est survenu suite à une étude du groupe de recherche du Dr. Béliveau sur le mécanisme de transcytose de la mélanotransferrine/p97 (MTf) via LRP-1 pour traverser la BHE (Demeule et al. 2002). La MTf est une molécule ayant une structure similaire à la Tf qui est aussi impliquée dans le transport du Fe (Gaillard et al. 2005b).

Le grand intérêt pour la MTf vient de son taux d'absorption rapide par le cerveau qui excède largement celui de la Tf et de son profil cinétique qui suggère une affinité plus faible pour son récepteur et qui en théorie favoriserait l'accumulation dans le parenchyme cérébral (Demeule et al. 2002, Georgieva et al. 2014, Lajoie et al. 2015). Dans cette étude de 2002, les auteurs ont observé que le volume de distribution cérébrale de la MTf était supérieur à celui de la Tf (Demeule et al. 2002). De plus, il est possible d'utiliser la MTf directement comme vecteur pour cibler la BHE, car contrairement à la Tf et à l'insuline, les concentrations plasmatiques de MTf sont relativement faibles (Georgieva et al. 2014). D'ailleurs, des études *in vivo* dans un modèle de tumeurs cérébrales ont démontré que des injections répétées de doxorubicin conjugué à la MTf augmentaient

significativement le taux de survie des animaux traités (Gabathuler et al. 2005). La technologie entourant l'utilisation de la MTf comme vecteur pour cibler la BHE est présentement en développement chez BioMarin Pharmaceuticals (Gaillard et al. 2005b). De plus, la MTf a aussi été utilisée comme vecteur ciblant le cerveau dans le cadre du développement de traitement dans un modèle murin de mucopolysaccharidose (syndrome d'Hurler) (Gabathuler 2012). Dans cette étude, l'enzyme lysosomale α -L-iduronidase a été conjugué à la MTf et suite à une injection, des analyses ont démontré une augmentation de l'activité enzymatique au cerveau en comparaison avec l'enzyme seul (Gabathuler 2012). Néanmoins, l'absence de données claires publiées confirmant visuellement la pénétration de ce ligand au cerveau jette un certain doute sur son potentiel.

Angiopep-2

La famille de peptides Angiopep a été développée suite à l'analyse du domaine KPI (*kunitz protease inhibitor*) de plusieurs protéines humaines se liant au récepteur LRP-1 dont l'aprotinine (Demeule et al. 2008a, Demeule et al. 2008b). Plusieurs études ont démontré l'importance du domaine KPI pour la liaison et l'internalisation de certains ligands via LRP-1 (Demeule et al. 2008b). Le clivage du domaine KPI de la protéine précurseur de l'amyloïde engendrait une importante diminution du transport de PPA via LRP-1 (Kounnas et al. 1995). Une étude effectuée par Demeule et collaborateurs a suggéré que le transport d'Angiopep-2 était médié par son interaction avec le récepteur LRP-1, car des analyses *in vitro* ont montré que l'accumulation d'Angiopep-2 était partiellement inhibée par l' α 2-macroglobuline (Demeule et al. 2008a).

Selon les études du groupe de la compagnie Angiochem, angiopep-2 serait le membre de la famille des Angiopeps possédant les meilleures propriétés comme vecteur pour cibler la BHE (Gabathuler 2012). Des études *in vivo* ont montré que l'accumulation au cerveau, exprimée sous forme de volume de distribution (mL/100g), mesuré par perfusion cérébrale *in situ*, était de 10-100 fois supérieur aux autres molécules étudiées dont la Tf (Demeule et al. 2008a, Demeule et al. 2008b). De plus, la conjugaison d'un composé fluorescent (Cy5.5) a permis la détection d'Angiopep-2 dans le parenchyme cérébral de souris 24 h suivant son administration par intraveineuse (Bertrand et al. 2010). Des analyses de colocalisation suggèrent la présence du complexe Cy5.5-Angiopep-2 dans les neurones et les astrocytes (Bertrand et al. 2010). La distribution cellulaire des peptides utilisés pour le ciblage cérébral est relativement compliquée, car il est plus difficile de développer des

anticorps spécifiques contre ces molécules. De plus, la conjugaison de molécules fluorescentes ou autres traceurs pourrait considérablement modifier les propriétés du peptide et venir biaiser l'analyse des résultats obtenus.

Angiopep-2 est au cœur de la conception d'une plate-forme technologique par la compagnie Angiochem Inc pour le développement de médicaments pour les tumeurs cérébrales (Gabathuler 2012). L'ANG1005/GRN1005 est le résultat de la conjugaison de trois molécules de paclitaxel aux groupements amines d'Angiopep-2 (Regina et al. 2008). Des études chez le rongeur ont démontré l'augmentation de la concentration de paclitaxel au cerveau suite à une injection d'ANG1005 en comparaison avec la molécule de chimiothérapie seule (Regina et al. 2008). De plus, ANG1005 a aussi été testé dans un modèle de tumeur cérébrale chez le rat nu (Gabathuler 2012). Cette étude a démontré que suite à l'implantation de cellules humaines de glioblastomes U87, on n'observait chez les animaux ayant été traités avec ANG1005 aucune augmentation de la taille des tumeurs en comparaison avec le paclitaxel seul et le véhicule (Gabathuler 2012).

Suite aux études précliniques, ANG1005 a fait l'objet d'études cliniques dans deux phases I/II parallèles, multicentriques, à doses croissantes chez des patients souffrant de gliome primaire récurrent ou de métastases cérébrales secondaires (Kurzrock et al. 2011, Gabathuler 2012, Drappatz et al. 2013). L'ANG1005 était administré par perfusion intraveineuse, une fois tous les 21 jours correspondant à un cycle de traitement, jusqu'à concurrence de 6 cycles (Gabathuler 2012; Kurzrock et al. 2012; Drappatz et al. 2013). Dans le cadre de ces études, des analyses ont démontré une augmentation du paclitaxel sous la forme d'ANG1005 dans les tissus tumoraux 4 h suivant la perfusion du composé chimiothérapeutique (Kurzrock et al. 2011, Gabathuler 2012, Drappatz et al. 2013). De plus, après 6 semaines de traitement, il a été observé chez une patiente de l'étude une réduction des tumeurs cérébrales (Gabathuler 2012). En date de 2016, suite à une étude clinique de phase II, l'administration d'ANG1005 a conduit à une amélioration des symptômes ainsi qu'une survie prolongée des patients souffrant de métastases au cerveau provenant d'un cancer du sein et de carcinomatose leptoméningé (NCT02755987). Suite aux résultats prometteurs obtenus, la *Food and Drug Administration* (FDA) aux États-Unis a donné son approbation pour la poursuite des études cliniques de phase III. De plus, deux autres études cliniques de phase II visant à déterminer

l'efficacité du composé chez des patients souffrant de tumeurs et de métastases cérébrales récurrentes sont toujours en cours (NCT01967810, NCT02048059).

Peptides pénétrants

Les peptides pénétrants (PP) ou *cell-penetrating peptides* en anglais sont des petits peptides très souvent chargés positivement qui peuvent traverser les membranes cellulaires généralement de manière non spécifique via des interactions électrostatiques avec les charges négatives des membranes cellulaires (Patel et al. 2007, Patel et al. 2013, Georgieva et al. 2014, Kristensen et al. 2016). Cependant, le mécanisme d'internalisation des PPs n'est toujours pas bien défini et impliquerait la formation de pores transitoires ou de micelles inversées (Georgieva et al. 2014). Les résultats de nombreuses études ont par ailleurs suggéré que leur mécanisme d'internalisation serait dépendant de la structure et des propriétés physicochimiques des PPs (Georgieva et al. 2014, Reissmann 2014). En effet, des analyses ont montré que le même peptide (TAT) pouvait être internalisé par deux mécanismes différents, soit l'endocytose médiée par la calveolae (Rodrigues et al. 2011) ou par la clathrine (Lindberg et al. 2013) lorsque conjugué à une protéine ou un fluorophore respectivement. Ces résultats suggèrent donc qu'il n'existerait pas qu'un seul mécanisme d'internalisation des PPs, mais plutôt différents mécanismes selon les caractéristiques structurales de ces peptides (Deshayes et al. 2004, Gros et al. 2006, Ziegler 2008, Tisseyre et al. 2013, Reissmann 2014). De plus, il est important de noter qu'il est très difficile d'étudier le transport des PPs seuls, car il n'existe pratiquement pas d'anticorps ciblant les PPs. Les résultats rapportés dans les différentes études seront donc grandement influencés par le choix des cargos conjugués aux PPs (Deshayes et al. 2004, Gros et al. 2006, Ziegler 2008, Rodrigues et al. 2011, Lindberg et al. 2013, Tisseyre et al. 2013, Reissmann 2014).

Indépendamment de leur mécanisme d'entrée, certaines études *in vivo* suggèrent tout de que les PPs, principalement le peptide TAT, dérivé du domaine de transduction du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), s'accumuleraient au cerveau ou seraient capable de médier un effet pharmacologique (Schwarze et al. 1999, Sethuraman et al. 2007, Rao et al. 2008). Cependant, il est encore aujourd'hui difficile de confirmer si le peptide TAT et les autres PPs arrivent bel et bien à traverser la BHE (Georgieva et al. 2014, Reissmann 2014). En effet, une étude a rapporté la détection de complexes formés par la conjugaison du peptide TAT avec des points quantiques dans

le parenchyme des animaux conjointement à une forte accumulation cérébrovasculaire (Santra et al. 2005). De plus, certaines études utilisant différentes nanoparticules comme cargo se contredisent. Une étude en particulier a démontré une libération prolongée de ritonavir au cerveau sur une période de 14 jours suite à une injection de nanoparticules formées de poly (L-lactide), mais a aussi montré une grande accumulation des nanoparticules conjuguées aux peptides TAT et non conjuguées dans les ventricules (Rao et al. 2008). Alors que dans une autre étude, utilisant une formulation micellaire de TAT-PEG-b-cholestérol conjugué avec des points quantiques, les auteurs ont montré une restriction des nanoparticules dans les capillaires cérébraux à certains endroits du cerveau autant qu'une pénétration dans le parenchyme dans d'autres régions (Liu et al. 2008). De plus, il est important de noter qu'en plus des difficultés méthodologiques associées à l'utilisation des PPs, les PPs utilisent majoritairement des mécanismes de transport non spécifiques pour entrer dans les cellules et suite à une injection systémique, les PPs risquent de s'accumuler à travers tous les tissus de l'organisme, pouvant ainsi réduire leur biodisponibilité pour le cerveau (Pardridge 2007c, Reissmann 2014).

Les autres peptides et protéines ciblant le cerveau

CRM197

CRM197 est une protéine non toxique dérivée de la toxine de la diphtérie couramment utilisée dans la fabrication de vaccins (Anderson 1983, Gaillard et al. 2005a, Gaillard et al. 2005b). Selon une étude de Gaillard et collaborateurs, CRM197 se lierait au récepteur de la toxine de la diphtérie pour pénétrer dans la cellule (Gaillard, 2006 #243). Ce récepteur est aussi connu sous l'appellation de précurseur de *l'heparin-binding epidermal growth factor-like* (HB-EGF) et est exprimé sur les CECCs, les neurones ainsi que les cellules gliales (Mishima et al. 1998). De plus, CRM197 possède un avantage thérapeutique intéressant, car son récepteur est surexprimé sur les CECCs dans certaines maladies, comme suite à une insulte ischémique (Mishima et al. 1998, Tanaka et al. 1999, Georgieva et al. 2014). Par contre, il existe un inconvénient associé à l'utilisation de CRM197. Il a été rapporté que l'injection de CRM197 peut stimuler la production d'anticorps neutralisants contre le dérivé de la toxine bactérienne ou que ces mêmes anticorps peuvent être déjà présents dans l'organisme suite à une vaccination préalable contre la diphtérie (Gaillard et al. 2005b, Gaillard et al. 2006). Ces

anticorps pourraient donc fortement augmenter la clairance systémique du vecteur et donc limiter son exposition ainsi que sa pénétration au cerveau.

Glutathion

La compagnie néerlandaise to-BBB a développé une technologie basée sur l'utilisation du GSH pour acheminer au cerveau différents médicaments (Holtman et al. 2014, Rip et al. 2014, Rotman et al. 2015, Lindqvist et al. 2016). Le GSH est un tripeptide endogène ayant des propriétés antioxydantes par son implication dans la détoxification de plusieurs métabolites intracellulaires. Selon des études *in vitro*, pourrait se lier sur un transporteur actif sodium dépendent abondamment présent sur les CECCs (Kannan et al. 1996, Kannan et al. 1999, Kannan et al. 2000, Georgieva et al. 2014). Cependant, le transport du GSH n'est toujours pas très bien caractérisé et pourrait aussi être médié par plusieurs transporteurs, dont les transporteurs d'anions organiques (OAT1 et OAT3) ainsi que l'échangeur sodium-dicarboxylate-2 (SDCT2) (Rip et al. 2009). De plus, il est important de prendre en considération que le GSH est aussi un ligand pour le transporteur d'efflux comme les MDRs (Rip et al. 2009).

Au cours des dernières années, la compagnie to-BBB a publié plusieurs articles démontrant le transport de différents médicaments (Doxil®/Caelyx®, DAMGO, méthylprednisone) via la *G-technology* qui consiste en la conjugaison de GSH sur une formulation liposomale PEGuylée (Birngruber et al. 2014, Holtman et al. 2014, Rip et al. 2014, Lindqvist et al. 2016). D'ailleurs, la formulation liposomale contenant de la doxorubicin ayant démontré une bonne efficacité à traiter les tumeurs cérébrales chez le rongeur a fait l'objet d'étude clinique de phase I/IIa chez des patients souffrant de gliome récurrent ou de métastases au cerveau (NCT01386580, NCT01818713). Cependant, malgré la fin de la plus récente étude clinique en janvier 2015, aucun résultat n'a toujours été publié. De plus, la compagnie to-BBB renommée BBB Therapeutics a déclaré faillite en janvier 2015.

RVG

Ce peptide RVG pour *rabies virus glycoprotein* a été développé en se basant sur le neurotropisme du virus de la rage qui est capable d'infecter les cellules du cerveau et donc traverser la BHE (Kumar et al. 2007, Lajoie et al. 2015). Cette glycoprotéine interagirait avec le récepteur de la N-acétylcholine

(RAch) présent au SNC ainsi que sur le CECCs. Spécifiquement, la liaison de la glycoprotéine sur la sous-unité $\alpha 7$ serait responsable du déclenchement du mécanisme de transcytose (Lentz 1990).

Le RVG, comme son nom l'indique, est donc directement dérivé de la portion de la glycoprotéine se liant au RAch. Une étude s'est par ailleurs penchée sur son accumulation cérébrale (Kumar et al. 2007). Dans cette étude, les concentrations au cerveau du RVG, mesurées via la détection des petits ARN interférents (pARNi) y étant conjugués, étaient significativement supérieures à un peptide contrôle suite à une injection intraveineuse (Kumar et al. 2007).

Pour permettre le transport de matériel génétique au cerveau, une version modifiée du peptide a été développée. L'ajout de 9 résidus arginine permet la liaison de matériel génétique comme les pARNi (Kumar et al. 2006, Kumar et al. 2007). En 2007, Kumar et collaborateurs ont montré une accumulation au cerveau de pARNi conjugués au peptide RVG-9R (Kumar et al. 2007). De plus, l'accumulation cérébrale s'est aussi traduite par un effet thérapeutique. L'injection intraveineuse de RVG-9R complexé avec des pARNi antiviraux a permis d'améliorer la survie de 80% des animaux dans un modèle de souris infectées avec un flavivirus causant des encéphalites (Kumar et al. 2006, Kumar et al. 2007). RVG peut aussi être conjugué à différentes nanoparticules et des études ont démontré des effets thérapeutiques des complexes RVG-nanoparticules contenant des pARNi ou des plasmides codant pour des ARN sous forme de *short harpin* (sh) dans des modèles animaux de la MA et la MP (Liu et al. 2009b, Cooper et al. 2014, Huo et al. 2015, Lajoie et al. 2015).

Depuis maintenant plus de 30 ans, des équipes de recherche ont travaillé à développer des vecteurs pour cibler la BHE et ainsi permettre une accumulation cérébrale de molécules thérapeutiques. Cependant, malgré plusieurs articles publiés dans des grands journaux, très peu de ces vecteurs ont réussi à aboutir en études cliniques. En analysant de plus près la littérature, on réalise rapidement que chaque équipe de recherche/compagnie travaille avec son propre vecteur et que peu d'études indépendantes viennent confirmer leurs résultats. De plus, certains vecteurs sont plus ou moins bien caractérisés et jettent un doute quant aux effets pharmacologiques et thérapeutiques observés. Le tableau 9 résume les forces et les faiblesses des principaux vecteurs utilisés pour le ciblage thérapeutique cérébral. Il est important de souligner que certains laboratoires travaillent exclusivement avec leurs vecteurs qui ne sont pas commercialisés. Ce point en particulier limite

grandement la reproductibilité des résultats par des équipes de recherche indépendantes. Il est ainsi impossible de venir confirmer ou infirmer les résultats publiés.

Tableau 9 : Résumé des forces et faiblesses des principaux vecteurs utilisés pour le ciblage thérapeutique au cerveau

Vecteurs	Type	Cible(s)	Forces	Faiblesses
R17	AcM	RTf murin	<ul style="list-style-type: none"> - AcM disponible commercialement - Caractérisation pharmacocinétique (Lee et al., 2000; Paris-Robidas et al., 2011; 2016; Alata et al., 2014) - Démonstration directe de la présence de l'AcM dans les CECCs (Paris-Robidas et al., 2011; 2016; Alata et al., 2014) - Enrichissement du RTf à la BHE (Enerson et Drewes, 2005; Zuchero et al., 2016) - Conjugaison nanoparticules (Elvest et al., 2007; van Rooy et al., 2011) 	<ul style="list-style-type: none"> - Démonstration indirecte de la pénétration au cerveau (van Rooy et al., 2011; Lee et al., 2000) - Effets pharmacologiques?
8D3	AcM	RTf murin	<ul style="list-style-type: none"> - AcM disponible commercialement - Caractérisation pharmacocinétique (Lee et al., 2000; Zhou et al., 2010a; 2010b) - Démonstration directe de la présence de l'AcM dans les CECCs (Paris-Robidas et al., 2011; Manich et al., 2013; Cabesson et al., 2015) - Enrichissement du RTf à la BHE (Enerson et Drewes, 2005; Zuchero et al., 2016) - Effets pharmacologiques (Zhang et al., 2004; Fu et al., 2010; Boado et al., 2011) - Conjugaison aux nanoparticules (Shi et al., 2001a; Zhang et al., 2004; Manich et al., 2013) 	<ul style="list-style-type: none"> - Démonstration indirecte de la pénétration au cerveau (Shi et al., 2001a; Schynder et al., 2005; Zhang et al., 2005) - Absence de reproductibilité des effets pharmacologiques
ox26	AcM	RTf rat	<ul style="list-style-type: none"> - AcM disponible commercialement - Caractérisation pharmacocinétique (Partridge et al., 1991; Bickel et al., 1994; Salto et al., 1995) - Démonstration directe de la présence de l'AcM dans les CECCs (Bickel et al., 1995; Moos et Morgan, 2001; Gask et al., 2004) - Enrichissement du RTf à la BHE (Enerson et Drewes, 2005; Zuchero et al., 2016) - Effets pharmacologiques (Shi et al., 2001b; Zhang et al., 2003; Zhang et Partridge, 2008) - Conjugaison aux nanoparticules (Huwylar et al., 1995; Shi et al., 2001b) 	<ul style="list-style-type: none"> - Démonstration indirecte de la pénétration au cerveau (Shi et al., 2001b) - Absence reproductibilité des effets pharmacologiques
anti-TfR/BACE	AcM	RTf murin	<ul style="list-style-type: none"> - Caractérisation pharmacocinétique (souris et singe) (Yu et al., 2011; 2014; Couch et al., 2013) - Enrichissement du RTf à la BHE (Enerson et Drewes, 2005; Zuchero et al., 2016) - Caractérisation mécanisme d'internalisation in vitro (Bien-Ly et al., 2014) - Diminution du peptide Aβ chez la souris C57Bl/6 (plasma et cerveau) et le singe (plasma, LSR et cerveau) (Yu et al., 2011; 2014) - Visualisation indirecte de l'anticorps au cerveau par détection immunologique (Yu et al., 2011; Bien-Ly et al., 2014) 	<ul style="list-style-type: none"> - Démonstration indirecte de la pénétration au cerveau (Yu et al., 2011; 2014; Bien-Ly et al., 2014) - Effets secondaires chez la souris (Couch et al., 2013) - Aucune étude indépendante, reproductibilité des résultats?
Brain shuttle	Fab	RTf murin	<ul style="list-style-type: none"> - Enrichissement du RTf à la BHE (Enerson et Drewes, 2005; Zuchero et al., 2016) - Caractérisation mécanisme d'internalisation in vitro et in vivo (Niewoehner et al., 2014; Vilosenor et al., 2016) - Effets pharmacologiques (Niewoehner et al., 2014) - Visualisation indirecte de l'anticorps au cerveau par détection immunologique (Niewoehner et al., 2014; Vilosenor et al., 2016) 	<ul style="list-style-type: none"> - Démonstration indirecte de la pénétration au cerveau (Niewoehner et al., 2014; Vilosenor et al., 2016) - Aucune étude indépendante, reproductibilité des résultats?
Mélanotransferrine	Protéine	LRP-1	<ul style="list-style-type: none"> - Surexpression LRP-1 dans les tumeurs cérébrales (Yamamoto et al., 1997) - Caractérisation pharmacocinétique (Demeule et al., 2002) - Effets pharmacologiques ? (Gabatthuler et al., 2005; 2012) 	<ul style="list-style-type: none"> - Très peu d'études - Démonstration indirecte de la pénétration au cerveau (Demeule et al., 2002; Gabatthuler et al., 2005) - Reproductibilité des résultats ?
Angiopep-2	Peptide	LRP-1	<ul style="list-style-type: none"> - Surexpression LRP-1 dans les tumeurs cérébrales (Yamamoto et al., 1997) - Caractérisation pharmacocinétique (Demeule et al., 2008a; 2008b) - Effets pharmacologiques (Régina et al., 2008; Kurzrock et al., 2012; Droppatz et al., 2013) - Étude clinique phase II (NCT02755987, NCT01967810, NCT02048059) - Démonstration directe de la présence du peptide conjugué avec un NHS-Cy5.5 dans le cerveau (Bertrand et al., 2010) 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficulté de détection des peptides - Études indépendantes, reproductibilité des résultats ?
83-14/HIRMAb	AcM	Récepteur de l'insuline humaine	<ul style="list-style-type: none"> - Caractérisation pharmacocinétique (Coloma et al., 2000; Boado et al., 2007; 2011; Lu et al., 2011; Hui et al., 2009) - Effets pharmacologiques (Boado et al., 2008; Boado et Partridge, 2009; Lu et al., 2011; Boado et al., 2009; Boado et al., 2011) - Étude clinique de phase I (NCT02371226) - Conjugaison aux nanoparticules (83-14) (Zhang et al., 2002; 2003) 	<ul style="list-style-type: none"> - Aucune étude indépendante, reproductibilité des résultats? - Démonstration indirecte de la pénétration au cerveau (Coloma et al., 2000; Zhang et al., 2003; Boado et al., 2009; 2011)
FC5	SvAb	Cdc50a	<ul style="list-style-type: none"> - Caractérisation pharmacocinétique (Hagqani et al., 2013; Farrington et al., 2014) - Effets pharmacologiques, liaison neuropeptide (Farrington et al., 2014) - Visualisation de l'anticorps au cerveau par détection immunologique (Farrington et al., 2014) 	<ul style="list-style-type: none"> - Caractérisation du récepteur? - Démonstration indirecte de la pénétration au cerveau (Hagqani et al., 2013) - Aucune étude indépendante, reproductibilité des résultats ?
Peptides pénétrants	Peptide	Variées	<ul style="list-style-type: none"> - Conjugaison aux nanoparticules (Santra et al., 2005; Rao et al., 2008; Liu et al., 2008) - Effets pharmacologiques (Rao et al., 2008; Schwarze et al., 1999; Sethuraman et Boe 2007) 	<ul style="list-style-type: none"> - Mécanismes d'internalisation mal définis (Georgieva et al., 2014; Reissmann 2014; Ziegler 2008; Tisseynre et al., 2013) - Difficulté de détection des peptides - Accumulation non-spécifique? (Reissmann 2014)
CRM197	Peptide	HB-EGF	<ul style="list-style-type: none"> - Surexpression HB-EGF dans certaines maladies (Tanaka et al., 1999; Mishima et al., 1998) 	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'anticorps anti-CRM197 (Gallard et al., 2005; Gallard et de Boer 2006) - Mauvaise caractérisation, très peu d'études (Gallard et al., 2005; 2006)
Glutathione	Tripeptide	OAT1? OAT2? SDCT2?	<ul style="list-style-type: none"> - Caractérisation pharmacocinétique (Holtman et al., 2014; Rip et al., 2014; Rotman et al., 2015; Lindqvist et al., 2014) - Étude clinique phase II (NCT01386580, NCT01818713) 	<ul style="list-style-type: none"> - Substrat Pgp (Rip et al., 2009) - Mécanisme passage au cerveau inconnu (Rip et al., 2009) - Démonstration indirecte de la pénétration au cerveau (Holtman et al., 2014; Rip et al., 2014; Rotman et al., 2015; Lindqvist et al., 2016) - Résultats d'étude clinique non-publiés - Aucune étude indépendante
RVG	Peptide	RAch	<ul style="list-style-type: none"> - Effets pharmacologiques (Kumar et al., 2006; 2007; Liu et al., 2013; Cooper et al., 2015; Liu et al., 2015) - Disponible commercialement - Conjugaison aux nanoparticules (Liu et al., 2015; Huo et al., 2015) 	<ul style="list-style-type: none"> - Démonstration indirecte de la pénétration au cerveau (Huo et al., 2015; Liu et al., 2013) - Reproductibilité des résultats (RVG-9R)? - Visualisation indirecte au cerveau avec un anticorps qui reconnaît le FITC des pARNI fluorescent (Kumar et al., 2007)