université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPÉCIALITÉ : INTERFACE CHIMIE BIOLOGIE

Par **Camille Ruffier**

Développement de polymersomes photoactivables pour la libération contrôlée dans le temps et l'espace de molécules dans le cerveau

Sous la direction de : Clémentine Bosch-Bouju

Soutenue le 29 septembre 2026

Membres du jury :

Mme BOSCH-BOUJU Clémentine	Maître de conférences, Nutrineuro (Bordeaux)	Directrice
Mme NADJAR Agnès	Professeure, IMN (Bordeaux)	Présidente du jury
Mme MURA Simona	Professeure, Institut Galien Paris-Saclay (Paris)	Rapportrice
M. VENANCE Laurent	Directeur de recherche, Collège de France (Paris)	Rapporteur
Mme MUTSCHLER Angela	Maître de conférences, LCPO (Bordeaux)	Examinatrice
M. CAZORLA Maxime	Chargé de recherche, INT (Marseille)	Examinateur

Membres invités :

M. LECOMMANDOUX Sébastien	Professeur, LCPO (Bordeaux)	Invité
M. MCCLENAGHAN Nathan	Directeur de recherche, ISM (Bordeaux)	Invité

Résumé

Développement de polymersomes photoactivables pour la libération contrôlée dans le temps et l'espace de molécules dans le cerveau

De nombreuses maladies neurologiques et neuropsychiatriques restent mal soignées et constituent une cause majeure d'invalidité dans le monde. Plusieurs de ces pathologies sont localisées dans une zone précise du cerveau et leur traitement reste insuffisant : les médicaments administrés par voie systémique n'atteignent les zones pathologiques qu'en concentrations limitées et sans contrôle spatio-temporel précis. Si la barrière hémato-encéphalique et l'hétérogénéité structurelle du cerveau limitent fortement la délivrance ciblée des médicaments, des approches alternatives comme la pharmacologie intracrânienne, ouvrent des perspectives prometteuses. Cependant, ces méthodes restent passives : la diffusion de médicament n'est ni dosable ni contrôlable dans le temps, ce qui limite leur efficacité clinique. Parallèlement, les nanotechnologies offrent des vecteurs stables et polyvalents, capables d'encapsuler et transporter efficacement divers agents thérapeutiques mais elles ne permettent pas, à elles seules, une délivrance localisée et déclenchée à la demande. Notre approche répond à ces limites en développant des polymersomes photoactivables capables de libérer leur contenu de manière localisée sous l'effet de la lumière.

Mes travaux reposent sur trois axes principaux : (i) la conception des polymersomes photoactivables et biocompatibles ; (ii) l'évaluation de leur innocuité afin d'assurer une utilisation sûre et efficace au niveau du tissu cérébral ; (iii) la démonstration d'une photolibération efficace de molécules actives dans des circuits neuronaux.

Nos travaux ont confirmé que le procédé d'émulsion-centrifugation constitue une méthode adaptée pour obtenir un rendement élevé de polymersomes photoactivables de taille micrométrique (diamètre moyen de 8.27 ± 0.14 µm), capables d'une libération rapide et localisée de leur contenu, avec un temps de rupture moyen de 6.39 ± 0.90 s. La biocompatibilité et la capacité de libération de ces polymersomes ont été évaluées in vitro sur des cultures primaires corticales murines. Ni l'illumination à 470 nm (fibre optique Ø 400 µm, NA 0.5, 20 s), ni l'incubation avec des polymersomes à des concentrations croissantes (0.6 à 9.103 polymersomes/puits), ni l'association des deux n'ont affecté la viabilité cellulaire. La

tolérance in vivo a été confirmée par l'injection des polymersomes dans le cerveau de souris et l'analyse de la réactivité gliale par immunomarquage des protéines IBA-1 et GFAP à 48 heures et 3 semaines après injection. Les polymersomes n'ont provoqué aucune réaction gliale au-delà de l'effet de l'injection stéréotaxique elle-même, démontrant que les polymersomes et leur photoactivation sont bien tolérés par les cellules et les tissus cérébraux. Afin de démontrer l'efficacité de la photolibération dans le tissu et de quantifier sa capacité à moduler les processus neuronaux, nous avons mis au point un protocole fondé sur la mesure de l'activité neuronale. Des enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés sur des coupes de cerveau de souris préservant la connexion synaptique entre les régions CA3 et CA1 de l'hippocampe, une zone clé impliquée dans les processus de mémorisation. Grâce à l'encapsulation puis la photolibération du CNQX (100 µM), un antagoniste compétitif des récepteurs AMPA/kaïnate, nous avons démontré que les polymersomes agissent comme des réservoirs à la demande, permettant une administration prolongée de médicaments et localisée autour du site d'injection.

En conclusion, les polymersomes photoactivables constituent un outil prometteur pour l'étude des mécanismes cérébraux et le développement de stratégies thérapeutiques innovantes. Leur potentiel est actuellement évalué *in vivo* dans un modèle murin de glioblastome, pour la libération ciblée de CNQX, afin de limiter l'invasion tumorale.

Mots-clés : polymersomes, délivrance ciblée de molécules, photostimulation, cerveau

Abstract

Development of photoactivable polymersomes for temporal et spatial control of molecular delivery into the brain

Many neurological and neuropsychiatric diseases remain poorly treated and constitute a major cause of disability worldwide. Several of these pathologies are localized to a specific area of the brain, and their treatment remains inadequate: systemically administered drugs reach the affected areas only in limited concentrations and without precise spatiotemporal control. While the blood-brain barrier and the structural heterogeneity of the brain severely limit the targeted delivery of drugs, alternative approaches such as intracranial pharmacology offer promising prospects. However, these methods remain passive: drug diffusion is neither dose-dependent nor controllable over time, which limits their clinical efficacy. Meanwhile, nanotechnologies offer stable and versatile vectors capable of efficiently encapsulating and transporting various therapeutic agents, but they do not, on their own, allow for localized and on-demand delivery. Our approach addresses these limitations by developing photoactivatable polymersomes capable of releasing their contents in a localized manner under light activation.

My work is based on three main axes: (i) the design of photoactivatable and biocompatible polymersomes; (ii) the evaluation of their safety in order to ensure safe and effective use at the level of brain tissue; (iii) the demonstration of an efficient photorelease of active molecules in neuronal circuits.

Our work confirmed that the emulsion-centrifugation process is a suitable method for obtaining a high yield of photoactivatable micrometer-sized polymersomes (mean diameter of 8.27 ± 0.14 µm), capable of rapid and localized release of their contents, with a mean release time of 6.39 ± 0.90 s. The biocompatibility and release capacity of these polymersomes were evaluated *in vitro* on primary murine cortical cultures. Neither illumination at 470 nm (optical fiber Ø 400 µm, NA 0.5, 20 s), nor incubation with polymersomes at increasing concentrations (0.6 to 9 x 10^3 polymersomes/well), nor the combination of the two affected cell viability. *In vivo* tolerance was confirmed by injecting polymersomes into the brains of mice and analyzing glial reactivity by immunolabeling IBA-1 and GFAP proteins 48 hours and 3 weeks post-injection. The polymersomes did not elicit any glial response beyond the effect

of the stereotaxic injection itself, demonstrating that the polymersomes and their photoactivation are well tolerated by brain cells and tissues. To demonstrate the efficacy of photorelease in brain tissue and to quantify its ability to modulate neuronal processes, we developed a protocol based on measuring neuronal activity. Electrophysiological recordings were performed on mouse brain sections preserving the synaptic connection between the CA3 and CA1 regions of the hippocampus, a key area involved in memory processes. Thanks to the encapsulation and then photorelease of CNQX (100 µM), a competitive antagonist of AMPA/kainate receptors, we have demonstrated that polymersomes act as on-demand reservoirs, allowing prolonged and localized drug administration around the injection site.

In conclusion, photoactivatable polymersomes represent a promising tool for studying brain mechanisms and developing innovative therapeutic strategies. Their potential is currently being evaluated *in vivo* in a murine model of glioblastoma for the targeted release of CNQX to limit tumor invasion.

Keywords: polymersomes, targeted molecular delivery, photostimulation, brain

Résumé grand public

De nombreuses maladies neurologiques et neuropsychiatriques restent difficiles à traiter, car les médicaments diffusent dans l'ensemble de l'organisme et n'atteignent pas efficacement les régions du cerveau concernées. Ce travail propose une nouvelle approche combinant l'efficacité des traitements pharmacologiques et la précision des techniques de neurostimulation. Elle repose sur des vésicules synthétiques, appelées polymersomes, capables d'encapsuler des molécules thérapeutiques puis de les libérer sous l'effet de la lumière. Cette activation lumineuse permet de contrôler précisément le lieu, le moment et la quantité de molécules délivrées dans le cerveau. Mes travaux ont porté sur la conception de ces polymersomes photoactivables, l'évaluation de leur biocompatibilité pour le tissu cérébral et la démonstration de leur capacité à libérer efficacement des molécules actives dans des réseaux de neurones.

Lay summary

Many neurological and neuropsychiatric diseases remain challenging to treat because drugs diffuse throughout the body and do not adequately reach targeted brain regions. This work proposes a new approach combining the efficacy of pharmacological treatments with the precision of neurostimulation techniques. It relies on synthetic vesicles called polymersomes, capable of encapsulating therapeutic molecules and releasing them upon light stimulation. This light activation enables precise control over location, timing, and dosage of drug delivery in the brain. My work focused on the design of these photoactivable polymersomes, the evaluation of their biocompatibility for brain tissue, and the demonstration of their ability to efficiently release active molecules in neuronal networks.

Unité de recherche

Laboratoire NutriNeuro (INRAE UMR 1286)
Directrice de l'unité : Lucile Capuron, directrice de recherche

Equipe FoodCircus
Equipe dirigée par Guillaume Ferreira et Pierre Trifilieff, directeurs de recherche

Tutelles du laboratoire :
INRAE, Université de Bordeaux, Bordeaux INP

Adresse :
Nutrineuro
146 Rue Léo Saignat
33076 Bordeaux, France

Financements du projet :
Université de Bordeaux (Bordeaux Emergence), Bordeaux INP, Agence Nationale de la Recherche (ANR-24-CE18-5491-01)

Remerciements

Au terme de ce travail de thèse, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à sa réalisation et qui m'ont accompagnée tout au long de cette aventure scientifique et humaine.

Je remercie sincèrement les membres du jury, la **Pr Agnès Nadjar**, la **Pr Simona Mura**, le **Dr Laurent Venance**, la **Dr Angela Mutschler** et le **Dr Maxime Cazorla**, pour l'honneur qu'ils me font en consacrant leur temps à la lecture et à l'évaluation de ce travail de thèse.

Je remercie l'Université de Bordeaux, Bordeaux INP, l'INRAE, et l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-24-CE18-5491-01) pour leur soutien financier, qui a permis la réalisation de ce projet.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, **Clémentine Bosch-Bouju**, pour ces quatre années passées ensemble. Clémentine, je te remercie pour ta confiance, ta disponibilité, la qualité de ton encadrement et tes précieux conseils scientifiques, ainsi que pour ton soutien et tes encouragements tout au long de cette aventure doctorale. Ce fut un immense plaisir de travailler à tes côtés. Je dois avouer que le défi était de taille : réaliser une thèse à l'interface entre les neurosciences et la chimie, alors que les neurosciences m'étaient encore totalement inconnues en 2022, n'était pas une évidence. Merci de m'avoir permis de découvrir ce nouveau domaine, qui a profondément enrichi mon parcours scientifique et conforté mon envie de poursuivre la recherche à l'interface entre la chimie et la biologie.

Je salue également la présence du **Pr Sébastien Lecommandoux** et du **Dr Nathan McClenaghan** en tant que membres invités de ce jury. Au-delà de votre présence lors de la soutenance, je tiens à vous remercier chaleureusement pour votre implication tout au long de ma thèse. Vos conseils, le partage de vos connaissances et la richesse de nos échanges ont largement contribué à l'avancement de ce projet. Sébastien, je te remercie également de m'avoir permis de travailler au sein du **LCPO** et de ton équipe. Merci pour l'accueil, les moyens mis à disposition et l'expertise apportée tout au long de ce projet, qui ont joué un rôle essentiel dans la réalisation de ces travaux. Je n'oublierai pas tous ces trajets à vélo entre le LCPO et NutriNeuro. Merci à mes petits polymersomes d'avoir voyagé avec moi dans mes sacoches !

Je remercie également la **Dr Lucile Capuron** de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de **NutriNeuro**. J'adresse également mes sincères remerciements à **Guillaume Ferreira** et **Pierre Trifilieff**, responsables de l'équipe FoodCircus, pour leur accueil, leur confiance et leur soutien tout au long de ma thèse.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de l'**équipe FoodCircus** ainsi que l'ensemble du personnel de l'unité pour leur aide précieuse et leur disponibilité. Merci **Jean-Christophe** pour la réalisation de l'ensemble des chirurgies stéréotaxiques de ce projet, toujours menées avec une efficacité remarquable. Merci **Florencia** pour ton aide précieuse lors des expériences d'immunofluorescence et de culture cellulaire. Merci **Céline** pour ton aide en immunofluorescence. Merci **Benjamin** pour ton aide dans les derniers mois du projet, pour m'avoir guidée et aidée à réaliser les dernières expériences de culture cellulaire. Je te souhaite le meilleur pour la suite et de profiter pleinement des années de thèse qui t'attendent. Prends bien soin de mes petits polymersomes ! Je tiens également à remercier **Zahra** et **Aryan** pour leur implication lors de leurs stages et leur contribution à l'avancement de ce projet.

Avant de rejoindre NutriNeuro pour ma thèse, j'ai eu la chance de découvrir le monde de la recherche lors de mon stage de Master 2 au sein du LCPO. Cette expérience a été une étape

particulièrement marquante de mon parcours, tant sur le plan scientifique qu'humain. Je remercie sincèrement **Sébastien**, qui m'a permis d'intégrer son laboratoire pour ce stage, réalisé sous la direction d'**Élisabeth Garanger** et aux côtés de **Leslie Dubrana**. Merci **Élisabeth** pour ton accompagnement, ta bonne humeur et la richesse de nos échanges scientifiques tout au long de cette expérience. **Sébastien**, je te remercie également d'avoir fait le lien avec Clémentine et de m'avoir parlé de ce sujet de thèse. **Leslie**, je te remercie sincèrement pour ton accompagnement tout au long de mon stage. Tes conseils, ta disponibilité et ton soutien m'ont permis d'acquérir des bases solides, qui ont été essentielles pour la réalisation de ma thèse. Par ton expertise, ta passion pour la recherche et ta manière de transmettre tes connaissances, tu as été une véritable source d'inspiration et tu as largement contribué à nourrir mon envie de poursuivre dans cette voie. Je garderai un souvenir très précieux de cette période passée à tes côtés. Je tiens également à remercier **Rosanna**, ma voisine de bureau pendant ce stage et avec qui j'ai eu la chance de commencer l'aventure doctorale en même temps. Merci pour tous les moments d'échange, ton soutien et ta bonne humeur au fil de ces années. Je te souhaite plein de bonheur pour la suite !

J'aimerais également remercier chaleureusement **Emmanuel** pour son aide si précieuse tout au long de cette thèse. Merci Manu pour ton expertise, en particulier sur les GUVs et les techniques de microscopie, mais aussi pour tous les conseils que tu m'as apportés au fil de ces années afin de comprendre, former et manipuler ces polymersomes. Que de temps passé ensemble au confocal ! À observer des polymersomes exploser tels des feux d'artifice du 14 juillet... et pourtant, nous ne nous en sommes jamais lassés. Après quatre années à les regarder vivre, fusionner ou éclater sous nos yeux, je crois même que ces moments finiront par me manquer. Merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur et la richesse de nos nombreux échanges, scientifiques comme plus légers. Ton aide et ton soutien ont compté bien plus que tu ne l'imagines, et cette thèse n'aurait certainement pas été la même sans toi. Et promis, j'essaierai de repasser pour t'apporter ta chocolatine !

Je souhaite également remercier mes collègues de bureau, la Team Lucien : **Sarah**, **Louise**, **Pauline**, **Flore** et **Mathilde**, sans qui ces quatre années de thèse n'auraient certainement pas eu la même saveur. **Sarah**, merci pour ta joie de vivre, ton écoute et tes desserts divins qui ont égayé bien des journées au laboratoire. Je te souhaite plein de belles choses pour la suite. Tu vas gérer ta thèse avec brio, et nous serons toutes là pour toi lorsque viendra ton tour de franchir la ligne d'arrivée. **Louise**, merci pour nos nombreuses discussions, nos débriefs passionnés de la Star Academy et de Top Chef, ainsi que toutes les galères partagées sur Inkscape. Merci aussi pour ton organisation, qui m'a toujours impressionnée et qui m'a souvent motivée à essayer d'en faire autant. **Pauline**, merci d'avoir été ma voisine de bureau pendant ces quatre années (littéralement juste à côté). Tu es l'une des personnes les plus fortes et les plus positives que je connaisse. S'il y a une chose que j'ai apprise à tes côtés, c'est bien d'essayer de rester optimiste quelles que soient les circonstances. **Flore**, merci pour ton sourire communicatif, ta bienveillance et ta disponibilité constante pour aider les autres. Je te souhaite le meilleur pour la suite et beaucoup de réussite dans tous tes projets. **Mathilde**, merci pour ton humour, ton franc-parler et les nombreuses pauses café (sans café) partagées. Tu es la maman du groupe, et ce n'est pas seulement une expression. Vous êtes toutes des personnes extraordinaires sur qui l'on peut compter, aussi bien dans les moments de réussite que dans les périodes plus difficiles. Merci de m'avoir accueillie et intégrée au sein de votre équipe de neuroscientifiques alors que je débarquais du monde de la chimie avec énormément de choses à apprendre. Merci pour votre aide précieuse tout au long de cette thèse. Votre bienveillance, votre bonne humeur et tous les moments partagés ont rendu cette aventure bien plus agréable et enrichissante. Je suis profondément reconnaissante d'avoir croisé votre chemin et d'avoir pu partager ces années à vos côtés.

Enfin, je souhaite remercier mes proches, qui m'ont accompagnée bien au-delà de cette aventure scientifique.

Je remercie mes amis de longue date (car je crois qu'après toutes ces années, on peut le dire) **Lucie**, **Amélie** et **Dorine**. Merci à toutes les trois pour votre soutien sans faille. Même si nous avons chacune suivi des chemins différents et évolué dans des domaines variés, nous avons toujours su être présentes les unes pour les autres. Merci pour vos encouragements, votre écoute et tous les moments partagés au fil des années. Merci également à **Enzo**, **Quentin**, **Valentin** et **Jean** pour votre soutien, vos encouragements et votre présence au fil de ces années.

Je souhaite ensuite adresser mes plus grands remerciements à ma famille. Merci **papa** et **maman** d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir soutenue, épaulée et d'avoir cru en moi, parfois même lorsque moi-même je doutais de mes capacités. Votre confiance, vos encouragements et votre soutien ont été essentiels pour avancer jusqu'ici. Je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui sans vous. Merci **Guillaume** de m'avoir inspirée par ton parcours et ta manière de travailler. Merci d'avoir été présent dans mes choix d'études et d'avoir pris le temps de faire avec moi ce fameux tableau « pour ou contre » une thèse, qui m'a aidée à prendre cette décision importante. Merci **Camille** pour ton soutien et ta présence au fil de ces années. Et merci également à mon petit neveu préféré, **Alexandre**. Promis, on organisera un grand « festin » pour fêter ça ensemble !

Enfin, je termine par toi, **Simon**. Merci d'être à mes côtés depuis maintenant dix ans. Merci d'avoir supporté mes humeurs, mes moments de doute et les longues soirées consacrées à l'écriture de cette thèse. Merci d'avoir été présent pendant ces mois intenses, à mes côtés, à attendre patiemment que je ferme enfin mon ordinateur. Je crois que je dois peut-être remercier davantage la Coupe du monde et la console de t'avoir aidé à rester éveillé jusqu'au bout… Mais surtout, merci pour ta patience, ton soutien et ta présence au quotidien. Cette aventure aurait été bien différente sans toi. Après ces quatre années à m'entendre répéter mes présentations, je crois même que tu connais mieux que moi l'introduction de ma thèse et que tu serais capable de la réciter sans hésiter !

Je vous souhaite maintenant une bonne lecture de ce manuscrit.

Table des matières

RESUME I

ABSTRACT III

RESUME GRAND PUBLIC V

LAY SUMMARY VI

UNITE DE RECHERCHE VII

REMERCIEMENTS VIII

TABLE DES MATIERES XII

LISTE DES ABREVIATIONS XV

LISTE DES TABLEAUX XVII

LISTE DES FIGURES XVIII

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE 5

1. SYSTEMES VESICULAIRES BIOMIMETIQUES ET POLYMERSOMES POUR LA DELIVRANCE CIBLEE DE MEDICAMENTS 11
1.1. EMERGENCE DE LA NANOMEDECINE 11
1.2. PRINCIPES DE DELIVRANCE CIBLEE DE MEDICAMENTS 14
1.3. SYSTEMES VESICULAIRES BIOMIMETIQUES POUR LA DELIVRANCE CIBLEE DE MEDICAMENTS 25
1.4. POLYMERSOMES : VESICULES POLYMERIQUES POUR LA DELIVRANCE CIBLEE 30
1.5. DEVELOPPEMENT DE POLYMERSOMES INTELLIGENTS POUR LA DELIVRANCE CIBLEE ET CONTROLEE 40
2. LE CERVEAU : UN ENVIRONNEMENT THERAPEUTIQUE COMPLEXE 51
2.1. ORGANISATION COMPARTIMENTEE ET HETEROGENEITE FONCTIONNELLE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL 51
2.2. PATHOLOGIES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET ENJEUX DU CIBLAGE THERAPEUTIQUE 56
2.3. LIMITES DE LA DELIVRANCE SYSTEMIQUE AU SYSTEME NERVEUX CENTRAL 59
2.4. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : UNE INTERFACE BIOLOGIQUE HAUTEMENT SELECTIVE ET RESTRICTIVE 60
2.5. STRATEGIES THERAPEUTIQUE LOCALES POUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL 67
2.6. DU BESOIN CLINIQUE A UNE STRATEGIE DE CONTROLE SPATIO-TEMPOREL DE L'INTERVENTION THERAPEUTIQUE 86

OBJECTIFS ET STRATÉGIE DE LA THÈSE 89

1. DES POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES POUR UNE DELIVRANCE CONTROLEE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL 91
1.1. INTERETS DE SYSTEME ACTIVABLES POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES NEUROLOGIQUES 91
1.2. LA LUMIERE COMME STIMULUS THERAPEUTIQUE 91
1.3. LES POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES : INTERFACE ENTRE DELIVRANCE THERAPEUTIQUE ET NEUROSTIMULATION 92
2. OBJECTIFS DE LA THESE 94

DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE 95

1. DEVELOPPEMENT ET CARACTERISATION DES POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES 99
1.1. FORMATION DES POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES PAR EMULSION-CENTRIFUGATION 99
1.2. ENCAPSULATION DE FLUOROPHORES ALTERNATIFS 102
1.3. CARACTERISATION DES POLYMERSOMES 102
1.4. PHOTOSTIMULATION DES POLYMERSOMES EN SOLUTION 105
1.5. POLYMERSOMES POUR LA PHOTOLIBERATION DU CNQX 106
2. VALIDATION DANS UN MODELE INTERMEDIAIRE DE TISSU CEREBRAL 107
2.1. PREPARATION DU *BRAIN PHANTOM* A BASE D'AGAROSE 107
2.2. DISPOSITIF D'INJECTION ET DE PHOTOSTIMULATION 108
2.3. PROTOCOLE D'INJECTION ET DE PHOTOSTIMULATION DANS LE *BRAIN PHANTOM* 108
3. NORMALISATION DES PARAMETRES DE PHOTOSTIMULATION 108
4. PHOTOSTIMULATION DES POLYMERSOMES DANS LE TISSU CEREBRAL 109
4.1. ANIMAUX 109
4.2. TRANSMISSION SYNAPTIQUE ET ELECTROPHYSIOLOGIE EXTRACELLULAIRE COMME LECTURE FONCTIONNELLE DE LA PHOTOLIBERATION 110
4.3. PREPARATION DES TRANCHES DE CERVEAU AIGUËS 111
4.4. INSTALLATION ELECTROPHYSIOLOGIQUE ET ACQUISITION DES DONNEES 112
4.5. PROTOCOLE DE PHOTOSTIMULATION DES POLYMERSOMES DANS LES TRANCHES HIPPOCAMPIQUES 114
5. EVALUATION DE LA BIOCOMPATIBILITE 114
5.1. EVALUATION *IN VITRO* DE LA CYTOTOXICITE DES POLYMERSOMES 114
5.2. EVALUATION DE LA TOLERANCE ET OPTIMISATION DES STRATEGIES DE DETECTION *IN VIVO* 117
6. ANALYSE STATISTIQUE 128
7. VUE D'ENSEMBLE DU PLAN EXPERIMENTAL 128

RÉSULTATS 131

1. DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION 136
1.1. EVALUATION DE LA COMPATIBILITE DES FLUOROPHORES ET DE LEUR REPONSE A LA PHOTOSTIMULATION 136
1.2. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PHOTOSTIMULATION DANS UN MODELE DE TISSU CEREBRAL (*BRAIN PHANTOM*) 139
1.3. OPTIMISATION DES STRATEGIES DE DETECTION *IN VIVO* 141
2. CONTROLE SPATIOTEMPOREL DE LA DELIVRANCE MOLECULAIRE DANS LE CERVEAU A L'AIDE DE POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES 151

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 181

1. SYNTHESE DES PRINCIPAUX RESULTATS 183
2. ATTEINTE DES OBJECTIFS DE LA THESE 185

2.1. DEVELOPPEMENT DES POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES 186
2.2. EVALUATION DE LA BIOCOMPATIBILITE 187
2.3. DEMONSTRATION DE LA PHOTOLIBERATION 189
3. LIMITES ET VERROUS DE L'APPROCHE 190
3.1. PHOTOSTIMULATION 190
3.2. POLYMERSOMES 192
3.3. EVALUATION BIOLOGIQUE 194
4. PERSPECTIVES 195
4.1. OPTIMISATION DU SYSTEME 195
4.2. VALIDATION *IN VIVO* 197
4.3. APPLICATIONS THERAPEUTIQUES 199
4.4. POTENTIALITES FUTURES DES POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES 202

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 205

Liste des abréviations

6-OHDA	6-hydroxydopamine
AAV	Virus adéno-associés
ABC	*ATP-Binding Cassette*
AC I	Anticorps primaire
AC II	Anticorps secondaire
ACSF	*Artificial cerebrospinal fluid*
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPA	Acide α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique
ANTS	Acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique
AON	Oligonucléotides antisens
AOTF	*Acousto-optic tunable filter*
AP	Antéro-postérieur
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CAR-T	*Chimeric antigen receptor T cells*
CED	*Convection-enhanced Delivery*
ChR2	Channelrhodopsine-2
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CPF	Cortex préfréontal
Cy5	Cyanine 5
Cy5.5	Cyanine 5.5
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DBS	*Deep brain stimulation*
DIPEA	N,N-diisopropyléthylamine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DV	Dorso-ventral
EPR	*Enhanced Permeability and Retention effect*
FBS	*Fetal Bovine Serum*
fEPSPs	Potentiels postsynaptiques excitateurs de champ
f_H	Fraction hydrophile
FRAP	*Fluorescence recovery after photobleaching*
GUV	*Giant unilamellar vesicles*
HS	Haut sucrose
IF	Immunofluorescence
ITO	Oxyde d'indium-étain
LED	Diodes électroluminescentes
LUV	*Large unilamellar vesicles*
MEC	*Minimum effective concentration*
MET	*Minimum toxic concentration*
ML	Médio-latéral
MLV	*Multilamellar vesicles*
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure
MVV	*Multivesicular vesicles*
NA	*Numerical aperture*
NBD	Nitrobenzoxadiazole
NIH	*National Institutes of Health*
NIR	Proche infrarouge
NP	Nanoparticule
NpHR	Halorhodopsine
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBD-*b*-PEG	Poly(butadiène)-*b*-poly(éthylène glycol)
PBS	*Phosphate-buffered saline*
Pc	Paramètre d'empilement
PCL	Poly(ε-caprolactone)
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEO-*b*-PEE	Poly(éthylène oxyde)-*b*-poly(éthylethylène)
PET	*Photo-induced electron transfer*
PFA	Paraformaldéhyde
P-gp	P-glycoprotéine
PLA	Poly(acide lactique)
PS-*b*-PAA	Poly(styrène)-*b*-poly(acide acrylique)
RhB	Rhodamine B
ROI	Région d'intérêt
SCP	Stimulation cérébrale profonde
siRNA	ARN interférents
SLC	*Solute carrier*
Str	Striatum
SUV	*Small unilamellar vesicles*
THF	Tétrahydrofurane
TMZ	Témozolomide
UV	Ultraviolets

Liste des tableaux

Tableau 1. Comparaison des principales propriétés membranaires des liposomes et polymersomes. _____ 38
Tableau 2. Exemples de polymersomes sensibles à différents stimuli endogènes et exogènes. _____ 41
Tableau 3. Impact de la BHE sur l'accès cérébral de différentes classes thérapeutiques et justification de nouvelles stratégies de ciblage. _____ 66
Tableau 4. Comparaison des principales stratégies permettant un contrôle local des interventions thérapeutiques dans le système nerveux central. _____ 87
Tableau 5. Paramètres d'acquisition en microscopie confocale à balayage laser des polymersomes selon les fluorophores utilisés. _____ 103
Tableau 6. Synthèse des formulations de polymersomes utilisés dans les expériences *in vivo*. _____ 118
Tableau 7. Organisation des cohortes expérimentales *in vivo*. _____ 122
Tableau 8. Coordonnées stéréotaxiques des sites d'injection utilisés pour chaque cohorte. _____ 124
Tableau 9. Conditions de marquage immunofluorescent pour les cohortes C1 et C1. _____ 127

Liste des figures

Figure 1. Echelle comparative des structures biologiques nanométriques. 12
Figure 2. Analyse bibliométrique de la recherche mondiale en nanomédecine entre 2000 et 2023. 14
Figure 3. Schéma des principales stratégies de ciblage vers les tissus cibles par les systèmes de délivrance de médicament. 16
Figure 4. Représentation schématique de la formation d'une couronne protéique autour d'un système de délivrance. 17
Figure 5. Evolution de la concentration plasmatique d'un médicament selon différents modes d'administration. 19
Figure 6. Optimisation des systèmes de délivrance. 20
Figure 7. Interactions protéines-systèmes de délivrance. 22
Figure 8. Fonctionnalisation de surface des systèmes de délivrance. 23
Figure 9. Principales classes de systèmes de délivrance utilisés en nanomédecine. 24
Figure 10. Structure schématique d'une membrane biologique. 26
Figure 11. Représentation schématique et détaillée des parties hydrophiles et hydrophobes de deux sortes de molécules amphiphiles. 27
Figure 12. Représentation schématique de la classification des vésicules. 28
Figure 13. Représentation schématique d'un liposome. 29
Figure 14. Représentation des sous-unités constitutives et des structures 2D et 3D des liposomes et des polymersomes. 30
Figure 15. Différentes morphologies d'objets à partir de copolymère amphiphile. 31
Figure 16. Schéma des différentes morphologies obtenues par autoassemblage de copolymères diblocs. 34
Figure 17. Vue d'ensemble des polymersomes et de leurs applications. 36
Figure 18. Représentation schématique des principales différences membranaires des liposomes et polymersomes. 38
Figure 19. Représentation schématique de la pénétration de la lumière dans les tissus biologiques à différentes longueurs d'onde. 43
Figure 20. Représentation des mécanismes moléculaires induits par la lumière à l'origine de la libération contrôlée des médicaments à partir des systèmes de délivrance. 44
Figure 21. Représentation schématique des flux d'eau à travers la membrane des vésicules selon différentes conditions osmotiques. 45
Figure 22. Comparaison de la réponse des polymersomes et des liposomes à une augmentation de la pression osmotique. 46
Figure 23. Organisation générale du système nerveux humain. 51
Figure 24. Principaux lobes cérébraux et fonctions associées. 52
Figure 25. Principales structures anatomiques internes du cerveau. 53
Figure 26. Principaux types cellulaires présents dans le système nerveux central. 54
Figure 27. Hétérogénéité cellulaire du cerveau révélée par la transcriptomique à cellule unique. 55
Figure 28. Perte des neurones dopaminergiques de la substance noire dans la maladie de Parkinson. 57
Figure 29. Principales caractéristiques du microenvironnement tumoral du glioblastome influençant la distribution des agents thérapeutiques. 58
Figure 30. Structure de la barrière hémato-encéphalique et de l'unité neurovasculaire. 61
Figure 31. Principales voies de franchissement de la barrière hémato-encéphalique. 62
Figure 32. Exclusion cérébrale de l'histamine après administration systémique. 63
Figure 33. Principaux axes thérapeutiques explorés pour intervenir localement dans le système nerveux central. 67
Figure 34. Principe de la stimulation cérébrale profonde. 69
Figure 35. Principe des systèmes de stimulation cérébrale profonde en boucle fermée. 71
Figure 36. Contrôle optique de l'activité neuronale à l'aide d'opsines photosensibles. 72
Figure 37. Principe de l'optogénétique *in vivo.* 73
Figure 38. Exemples de dispositifs optogénétiques miniaturisés sans fil intégrant des micro-LED. 75

Figure 39. Principales voies de délivrance intracrânienne de médicaments dans l'épilepsie pharmacorésistante. 77
Figure 40. Principales technologies de délivrance intracrânienne de médicaments utilisées pour la stimulation des réseaux épileptiques. 77
Figure 41. Principales stratégies de délivrance locale de médicaments dans le glioblastome. 79
Figure 42. Approches de délivrance locale de médicaments dans le glioblastome. 82
Figure 43. Intégration fonctionnelle de greffons dopaminergiques dans un modèle de maladie de Parkinson. 85
Figure 44. Stratégie proposée pour le contrôle spatio-temporel de la délivrance moléculaire dans le cerveau. 93
Figure 45. Schéma de principe de la formation des polymersomes par émulsion-centrifugation. 100
Figure 46. Détermination de la concentration des polymersomes par comptage sur chambre de Malassez. 105
Figure 47. Préparation du modèle intermédiaire du tissu cérébral (brain phantom) à base d'agarose et dispositif d'injection associé. 107
Figure 48. Principe expérimental de l'évaluation de la photolibération de CNQX par électrophysiologie extracellulaire dans la voie hippocampique CA3-CA1. 111
Figure 49. Configuration du dispositif d'injection et d'enregistrement électrophysiologique utilisé pour l'étude des polymersomes photoactivables. 113
Figure 50. Réaction de réduction du MTT en formazan par l'activité mitochondriale des cellules viables. 117
Figure 51. Réaction de couplage entre le polymère PBD-NH_2 et le fluorophore Cy5.5 NHS ester. 120
Figure 52. Représentation schématique du procédé d'électroformation des polymersomes. 120
Figure 53. Représentation schématique du procédé d'extrusion des polymersomes marqués à la cyanine 5.5. 122
Figure 54. Repères anatomiques et appareil stéréotaxique utilisés pour les injections intracérébrales. 123
Figure 55. Principe de la transparisation du tissu cérébral. 125
Figure 56. Schéma général de la démarche expérimentale suivie au cours de cette thèse pour le développement des polymersomes photoactivables. 129
Figure 57. Encapsulation de différents fluorophores dans les polymersomes : structures chimiques, longueurs d'onde d'excitation et observations par microscopie confocale. 137
Figure 58. Caractérisation des polymersomes chargés en thiocoumarine (20 mM). 138
Figure 59. Images confocales de polymersomes marqués à la rhodamine B après injection dans un gel d'agarose. 139
Figure 60. Photostimulation de polymersomes chargés en calcéine dans un gel d'agarose. 140
Figure 61. Images confocales de polymersomes chargés en thiocoumarine et marqués à la rhodamine B au niveau de leur membrane. 141
Figure 62. Distribution des polymersomes injectés dans le striatum et évaluation du volume tissulaire. 142
Figure 63. Analyse de la colocalisation des polymersomes marqués à la rhodamine B avec les neurones du striatum. 143
Figure 64. Analyse de la colocalisation des polymersomes marqués à la rhodamine B avec les cellules microgliales du striatum. 144
Figure 65. Analyse de la colocalisation des polymersomes marqués à la rhodamine B avec les astrocytes du striatum. 144
Figure 66. Comparaison de la colocalisation des polymersomes marqués à la rhodamine B avec les neurones, les microglies et les astrocytes du striatum à différents temps post-injection. 145
Figure 67. Images confocales de polymersomes chargés en cyanine 5. 146
Figure 68. Exemple de reconstruction 3D d'un cerveau clarifié. 147
Figure 69. Images confocales des polymersomes marqués à la cyanine 5.5 au niveau de leur membrane. 148
Figure 70. Vue d'ensemble des étapes de développement et des principaux résultats obtenus avec les polymersomes photoactivables. 184
Figure 71. Vue d'ensemble du système de polymersomes photoactivables développé dans cette thèse. 185
Figure 72. Photostimulation en solution de polymersomes extrudés à 5 µm chargés en calcéine. 196
Figure 73. Interactions neuronales impliquées dans la progression du glioblastome. 201
Figure 74. Perspectives d'évolution des polymersomes photoactivables pour la délivrance contrôlée de molécules dans le système nerveux central. 203

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les maladies neurologiques et neuropsychiatriques représentent une cause majeure d'invalidité à l'échelle mondiale et demeurent, pour beaucoup, insuffisamment contrôlées par les stratégies thérapeutiques classiques. Une partie de ces pathologies est associée à des altérations localisées de circuits cérébraux spécifiques, rendant nécessaire le développement d'approches capables d'agir de manière ciblée au sein du système nerveux central. Cependant, la mise en œuvre de telles stratégies se heurte à plusieurs contraintes majeures propres au tissu cérébral. La barrière hémato-encéphalique restreint fortement l'accès des agents thérapeutiques administrés par voie systémique, tandis que l'hétérogénéité structurale et fonctionnelle du cerveau complique leur distribution au sein des régions cibles. Même les approches de pharmacologie intracrânienne, qui permettent une administration locale, reposent essentiellement sur des mécanismes de diffusion passive offrant un contrôle limité de la distribution spatiale et de la cinétique de libération des molécules administrées. Dans le système nerveux central, la précision de la délivrance constitue pourtant un enjeu essentiel. La proximité de structures cérébrales aux fonctions distinctes et l'organisation complexe des réseaux neuronaux nécessitent des outils capables de délivrer des agents thérapeutiques de manière localisée. Le développement de systèmes répondant simultanément à ces exigences demeure aujourd'hui un défi majeur pour les stratégies de délivrance intracérébrale.

Dans ce contexte, la nanomédecine a permis l'émergence de nombreux systèmes de transport capables d'encapsuler, de protéger et de véhiculer une grande variété de molécules thérapeutiques. Parmi eux, les polymersomes se distinguent par leur grande modularité, liée à la diversité des copolymères constitutifs pouvant être utilisés pour leur conception. Ils présentent également une stabilité physicochimique élevée et offrent la possibilité d'adapter certaines de leurs propriétés en fonction des contraintes de l'application visée. Afin d'améliorer encore le contrôle de la délivrance, des polymersomes sensibles à différents stimuli ont été développés au cours des dernières années. Ces systèmes permettent de déclencher la libération de leur contenu en réponse à un signal externe ou à une modification de leur environnement. Parmi les différents stimuli étudiés, la lumière présente un intérêt particulier en raison de sa capacité à fournir un contrôle précis, à la fois spatial et temporel, du déclenchement de la libération. Malgré ce potentiel, l'utilisation de polymersomes photoactivables pour la délivrance locale d'agents thérapeutiques au sein du système nerveux central reste encore peu explorée.

Ce travail repose sur l'idée que des polymersomes photoactivables peuvent constituer un système de délivrance capable d'assurer simultanément l'encapsulation de molécules d'intérêt, leur stabilité dans l'environnement cérébral et leur libération contrôlée à la demande sous stimulation lumineuse. L'objectif de la thèse est ainsi de concevoir, caractériser et évaluer de tels systèmes pour explorer leur potentiel pour le contrôle spatio-temporel de la délivrance moléculaire dans le tissu cérébral.

Ce manuscrit est organisé autour de quatre parties principales. La **première partie** correspond à une synthèse bibliographique conduisant aux objectifs de la thèse. Elle introduit les polymersomes photoactivables dans le contexte de la nanomédecine, leur intérêt pour la délivrance contrôlée de molécules actives, ainsi que la spécificité du système nerveux central qui motivent leur développement. La **deuxième partie** décrit l'approche expérimentale mise en œuvre au cours de ce travail pour la conception, la caractérisation et l'évaluation fonctionnelle des polymersomes photoactivables pour la libération de molécules dans le tissu cérébral. La **troisième partie** présente les résultats obtenus au cours de la thèse. Elle comprend une première sous-partie consacrée au développement et à l'optimisation des polymersomes photoactivables et biocompatibles, ainsi qu'un article scientifique intitulé « *Spatiotemporal control of molecular delivery in the brain using photoactivable polymersomes* » en cours de publication. Enfin, la **quatrième partie** est dédiée à la discussion générale des résultats et aux perspectives de ces travaux pour la délivrance contrôlée de molécules dans le système nerveux central.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'étude bibliographique est structurée en deux chapitres complémentaires.

Le **premier chapitre** présente les concepts et les outils qui constituent le socle de ce travail. Après une introduction aux principes de la délivrance ciblée de médicaments et à la nanomédecine, il retrace l'évolution des systèmes vésiculaires utilisés pour le transport de molécules thérapeutiques, des liposomes aux polymersomes. Une attention particulière est portée aux polymersomes sensibles à des stimuli externes, et plus spécifiquement aux systèmes photoactivables, qui constituent le cœur de l'approche développée dans cette thèse.

Le **second chapitre** s'intéresse au système nerveux central en tant que cible thérapeutique. Il présente les principales contraintes associées à la délivrance de médicaments au cerveau ainsi que les enjeux liés au contrôle spatial et temporel des interventions thérapeutiques. Ces problématiques sont illustrées à travers trois pathologies 'modèles', la maladie de Parkinson, l'épilepsie et le glioblastome, qui malgré leurs spécificités, soulignent toutes la nécessité de disposer de stratégie de délivrance précises dans le temps et l'espace.

L'ensemble de ces éléments permet d'établir le cadre scientifique nécessaire à la compréhension des travaux présentés dans la suite de ce manuscrit.

CHAPITRE 1

1. SYSTEMES VESICULAIRES BIOMIMETIQUES ET POLYMERSOMES POUR LA DELIVRANCE CIBLEE DE MEDICAMENTS

1.1. EMERGENCE DE LA NANOMEDECINE

Depuis l'Antiquité, l'être humain a cherché à se soigner à partir des ressources disponibles dans le monde vivant, en observant notamment les effets de plantes médicinales et d'extraits naturels sur la santé (Davis 2023). Ces pratiques empiriques ont progressivement évolué vers une médecine structurée reposant principalement sur l'utilisation de remèdes d'origine naturelle, marquant les débuts de la pharmacopée traditionnelle (Hassan 2015). Le développement conjoint de la médecine et de la chimie a ensuite constitué une étape décisive, permettant l'isolement et la caractérisation des molécules d'intérêt à l'origine des principes actifs. Cette avancée a conduit à l'émergence des premiers médicaments, puis au développement de la chimie de synthèse, offrant la possibilité de concevoir des composés aux propriétés pharmacologiques optimisées en termes d'efficacité et de sécurité. Malgré ces progrès, l'activité thérapeutique de ces molécules reste fortement dépendant de leur comportement *in vivo*, remettant en question l'idée que leur efficacité puisse être uniquement attribuée à leur structure chimique.

Dans ce contexte, la conception du médicament a évolué vers une approche plus intégrée, dans laquelle le mode d'administration et la formulation constituent des paramètres déterminants de l'efficacité thérapeutique. La pharmacie galénique s'est ainsi développée autour de l'optimisation de la forme galénique (Poisson 2003), initialement considérée comme un simple support d'administration sans impact direct sur l'activité du médicament. Les effets biologiques étaient ainsi attribués exclusivement à la structure moléculaire du principe actif. Cependant, cette vision présente des limites importantes *in vivo*, notamment en termes de distribution non contrôlée, de toxicité systémique et d'efficacité réduite dans les tissus cibles. Ces limites ont progressivement mis en évidence la nécessité de stratégies permettant de mieux contrôler le devenir des médicaments dans l'organisme (Puisieux, Seiller, and Devissaguet 2006).

A partir des années 1950, l'émergence de la biopharmacie a marqué une évolution majeure dans la compréhension du médicament, en mettant en évidence le rôle déterminant de la forme galénique sur le comportement du principe actif *in vivo* et son efficacité thérapeutique. Cette évolution a marqué le début des systèmes de délivrance ciblée, visant

non seulement à administrer une molécule active, mais également à moduler sa libération, sa distribution et son interaction avec les tissus biologiques (Puisieux, Seiller, and Devissaguet 2006). Cette transition constitue un changement de paradigme fondamental : le médicament n'est plus uniquement une substance active, mais un système fonctionnel conçu.

Dans cette continuité, la nanomédecine s'est imposée comme une discipline pluridisciplinaire à l'interface de l'ingénierie, de la chimie, de la physique et de la biologie, visant à exploiter les propriétés spécifiques des objets nanométriques pour des applications diagnostiques et thérapeutiques (Wagner et al. 2006). Inspirée par les systèmes biologiques (**Figure 1**), tels que l'ADN, les protéines ou les virus, elle repose sur l'utilisation de structures capables d'interagir à l'échelle moléculaire avec leur environnement, ouvrant la voie à des stratégies de délivrance et de ciblage de haute précision (R. Duncan and Gaspar 2011).

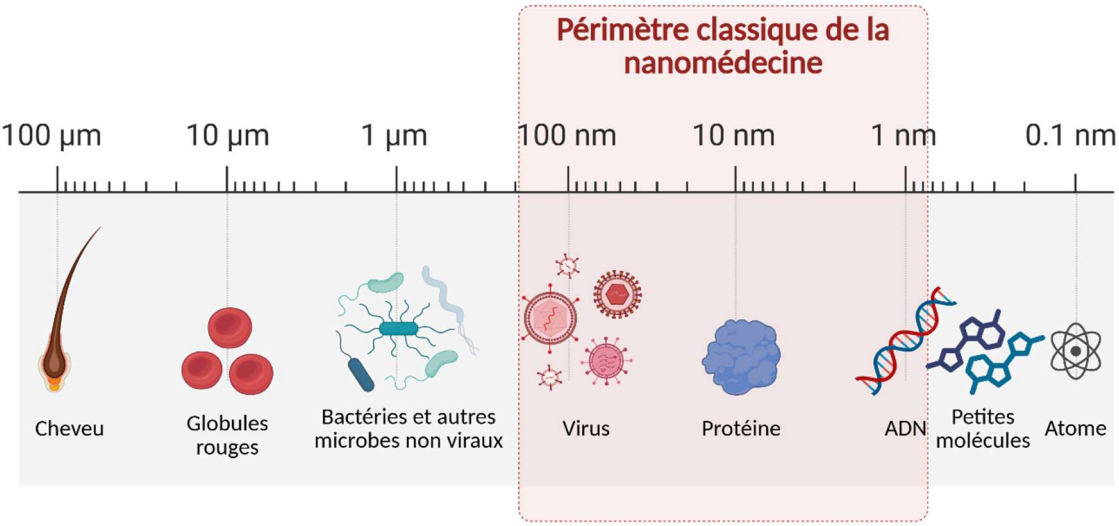


Figure 1. Echelle comparative des structures biologiques nanométriques.
ADN : acide désoxyribonucléique. *Adaptée de Stiepel et al. (2023)*

Bien que classiquement définie par une échelle dimensionnelle comprise entre 1 et 100 nm selon le *National Institutes of Health* (NIH), la nanomédecine dépasse aujourd'hui ce cadre strict (National Institutes of Health (NIH) 2025; Schäfer-Korting and Schubert 2024; Stiepel et al. 2023). De nombreux systèmes utilisés en clinique présentent des tailles supérieures à cette plage, tels qu'Abraxane (130 nm), Myoset (150-250 nm), TargomiRs (100-400 nm) ou encore Optison (3-4.5 µm) (Stiepel et al. 2023). Certaines approches explorent également des systèmes de taille cellulaire (1-25 µm et au-delà) (Stiepel et al. 2023). Cette évolution met en évidence une redéfinition progressive du domaine, qui ne peut plus être

exclusivement basée sur la taille, mais doit être comprise comme un ensemble de stratégies visant à concevoir des systèmes capables de répondre à des objectifs thérapeutiques spécifiques (LaVan, McGuire, and Langer 2003; Whitesides 2003).

Le développement de la nanomédecine s'accompagne d'une croissance continue de la production scientifique, témoignant de l'intérêt majeur porté à ces approches à l'échelle mondiale. Une analyse bibliométrique basée sur la base de données *Web of Science* met en évidence une croissance exponentielle du nombre de publications en nanomédecine depuis les années 2000 (**Figure 2A**) (J. Wang et al. 2024). Le champ de la *drug delivery*, que l'on peut traduire en français par la délivrance ciblée de médicaments, est l'un des plus explorés en nanomédecine et représente une part importante des travaux publiés (**Figure 2B**) (J. Wang et al. 2024).

Cette dynamique s'accompagne d'une expansion géographique dominée par les Etats-Unis, la Chine et l'Europe, soulignant l'intérêt croissant de la communauté scientifique pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques basées sur les nanotechnologies (J. Wang et al. 2024).

La délivrance de médicaments ne peut plus être considérée comme un simple phénomène de diffusion passive, mais comme le développement de systèmes fonctionnels capables de contrôler précisément la distribution, la protection et l'interaction des agents thérapeutiques avec les environnements biologiques (Puisieux, Seiller, and Devissaguet 2006). Dans ce contexte, la nanomédecine permet aussi de limiter l'exposition non spécifique des tissus sains et de réduire certaines toxicité systémiques, notamment hépatiques et rénales, en améliorant la sélectivité de distribution des agents thérapeutiques (Puisieux, Seiller, and Devissaguet 2006). Ces approches ont trouvé un intérêt particulier en oncologie, où l'index thérapeutique étroit de nombreux agents anticancéreux rend indispensable un contrôle fin de la biodistribution, autrement dit de leur répartition au sein des différents tissus et organes après administration (Lammers 2024). L'index thérapeutique correspond au rapport entre la dose entraînant un effet toxique et la dose efficace, et reflète la marge de sécurité d'un médicament. Dans ce contexte, la maîtrise des principes de la délivrance ciblée est indispensable à la conception de systèmes thérapeutiques efficaces et les recherches menées au cours de cette thèse est au cœur de ces enjeux.

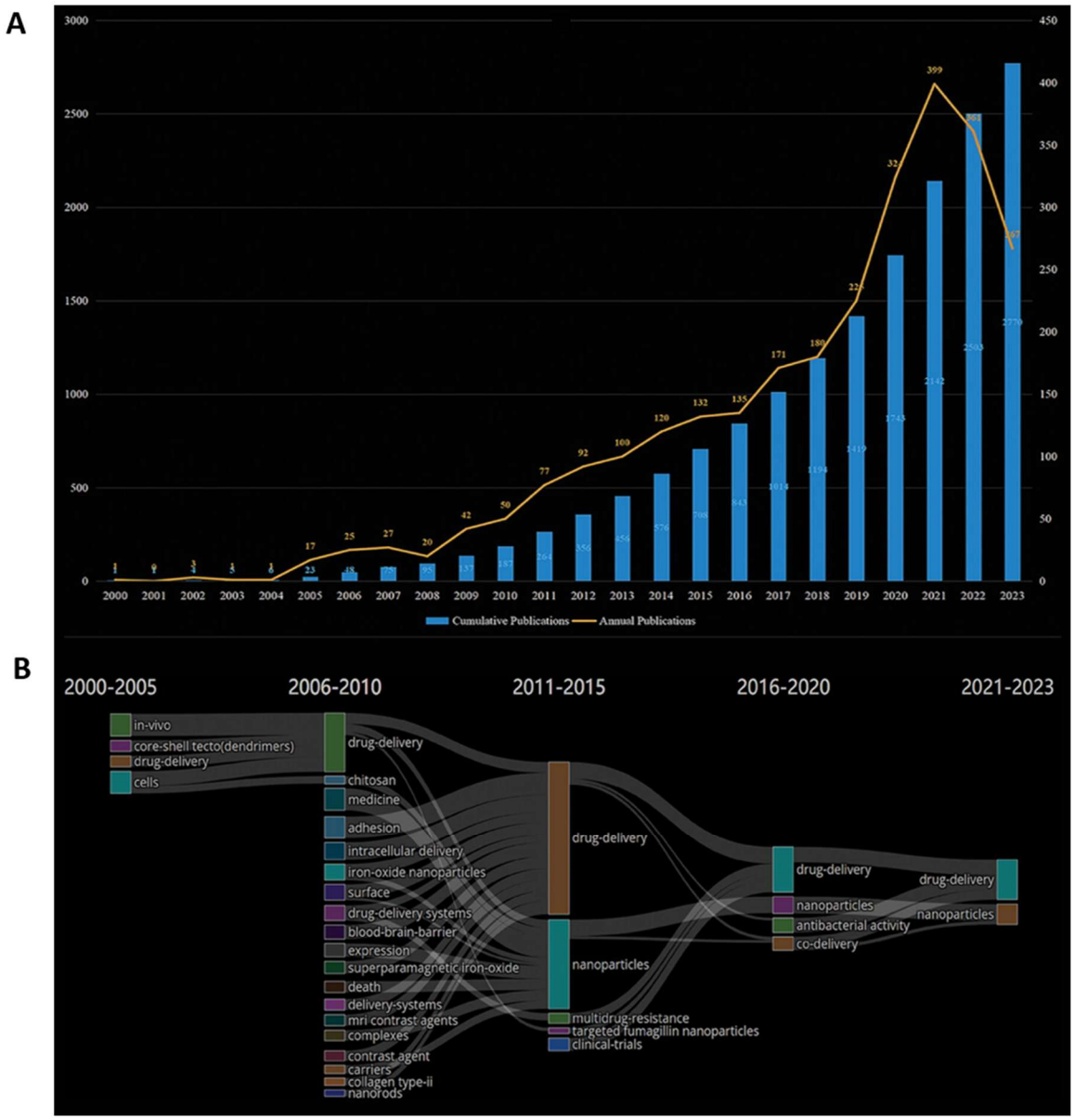


Figure 2. Analyse bibliométrique de la recherche mondiale en nanomédecine entre 2000 et 2023.
(A) Production annuelle et cumulée de publications scientifiques en nanomédecine de 2000 à 2023. **(B)** Evolution thématique de recherche en nanomédecine entre 2000 et 2023, établie à l'aide de l'outil d'analyse bibliométrique thématique R. Les thématiques prédominantes au cours des dernières années sont la *drug delivery* et les nanoparticules (NPs). *Adaptée de Wang et al. (2024).*

1.2. PRINCIPES DE DELIVRANCE CIBLEE DE MEDICAMENTS

1.2.1. Objectifs et enjeux de la délivrance ciblée

Les systèmes de délivrance ciblée reposent sur l'utilisation de matériaux capables d'encapsuler, de transporter et/ou de libérer les médicaments de manière contrôlée au sein de l'organisme (Mitchell et al. 2021). Ils ont été développés pour surmonter les limites des formulations conventionnelles et visent à améliorer l'accumulation des médicaments au

niveau de la zone pathologique tout en limitant leur distribution non spécifique dans les tissus sains (Mitchell et al. 2021). Cette approche vise à optimiser l'efficacité thérapeutique et de réduire les effets secondaires liés à une biodistribution non contrôlée (Puisieux, Seiller, and Devissaguet 2006).

L'encapsulation est un élément central de ces systèmes. Elle permet de moduler les propriétés pharmacocinétiques des molécules thérapeutiques, c'est-à-dire leur absorption, leur distribution, leur métabolisme et leur élimination au sein de l'organisme (Peer et al. 2007). Elle améliore aussi la solubilité de composés hydrophobes, prolonge le temps de circulation des agents thérapeutiques et favorise leur accumulation dans certains tissus cibles, notamment les tumeurs solides (Puisieux, Seiller, and Devissaguet 2006). Par ailleurs, elle protège les molécules actives du milieu biologique en limitant leur dégradation enzymatique, les variations de pH et certaines interactions non spécifiques avec les protéines plasmatiques, facteurs responsables de l'inactivation ou de l'élimination rapide des formulations classiques. Cette protection augmente ainsi leur stabilité *in vivo* et leur disponibilité au site d'action (Peer et al. 2007). Dans certains cas, ces systèmes facilitent aussi l'internalisation cellulaire et permettent une libération contrôlée du principe actif. L'ensemble de ces propriétés a pour vocation d'améliorer l'indice thérapeutique, en augmentant l'efficacité du traitement et/ou en réduisant sa toxicité (Farokhzad and Langer 2009).

L'un des principaux objectifs des systèmes de délivrance ciblée est d'orienter les agents thérapeutiques vers des tissus ou des cellules spécifiques. Deux grandes stratégies de ciblage ont ainsi été développées pour améliorer la spécificité d'action des traitements (Farokhzad and Langer 2009; Peer et al. 2007).

1.2.2. Stratégie de ciblage thérapeutique

Le ciblage thérapeutique peut être réalisé par deux stratégies différentes : le ciblage passif et le ciblage actif (**Figure 3**).

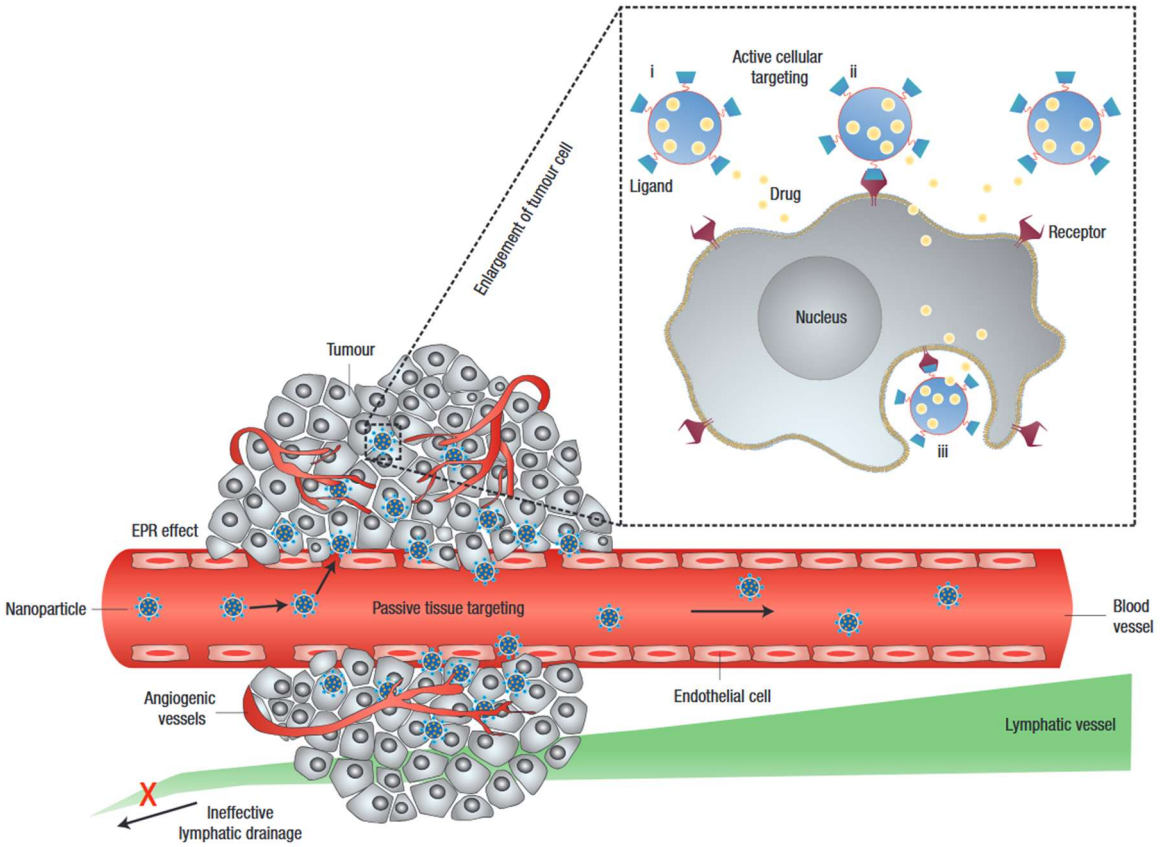


Figure 3. Schéma des principales stratégies de ciblage vers les tissus cibles par les systèmes de délivrance de médicament.
Le ciblage passif repose sur l'accumulation des systèmes au niveau tumoral grâce à la perméabilité accrue des vaisseaux tumoraux et un drainage lymphatique déficient (effet EPR). Le ciblage actif (encart) est obtenu par la fonctionnalisation de la surface des systèmes avec des ligands permettant une reconnaissance et une liaison spécifiques aux cellules cibles. Les systèmes peuvent : (i) libérer leur contenu à proximité des cellules cibles ; (ii) se fixer à la membrane cellulaire et agir comme un réservoir extracellulaire de médicament à libération prolongée ; ou (iii) pénétrer dans la cellule. *Reproduite de Peer et al. (2007).*

Le ciblage passif (**Figure 3**) est fondé sur l'effet d'hyperperméabilité et de rétention (EPR), décrit par Maeda et al. (Matsumura and Maeda 1986), concept initialement mis en évidence et principalement exploité dans le contexte des tumeurs solides. Dans ce cadre, l'angiogenèse rapide conduit à la formation de vaisseaux présentant une perméabilité accrue, avec des pores de taille comprise généralement entre 100 et 400 nm (Iyer et al. 2006; Matsumura and Maeda 1986). Cette organisation vasculaire permet aux systèmes de délivrance circulant dans le sang de diffuser passivement à travers la paroi et de s'accumuler dans le tissu tumoral, où ils sont retenus en raison d'un drainage lymphatique inefficace (Behzadi et al. 2017; Peer et al. 2007). Cependant, ce mécanisme présente des limites importantes *in vivo*. Après administration systémique, les systèmes de délivrance

interagissent rapidement avec des biomolécules plasmatiques, essentiellement des protéines, conduisant à la formation d'une couronne protéique dynamique à leur surface (**Figure 4**).

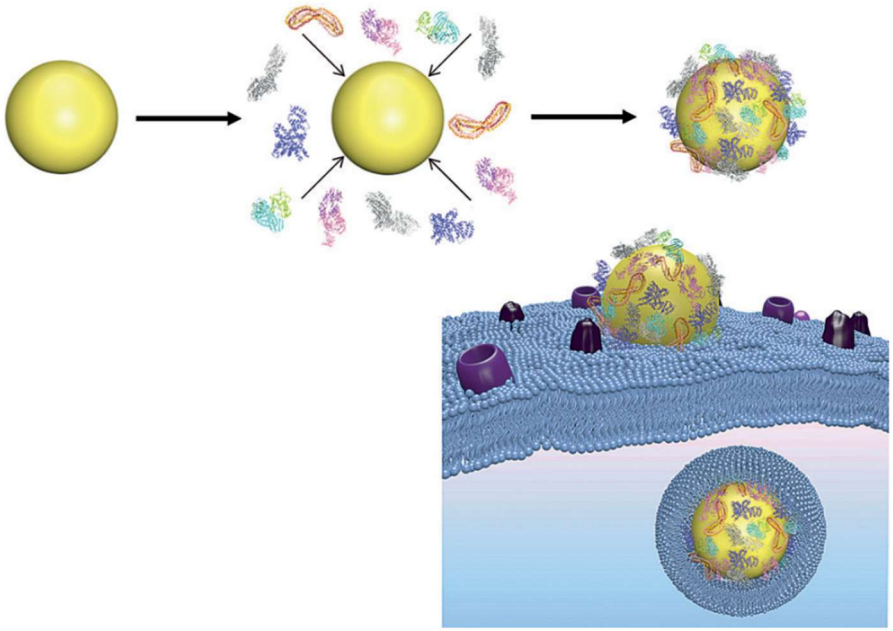


Figure 4. Représentation schématique de la formation d'une couronne protéique autour d'un système de délivrance.
Une particule initialement dépourvue de protéines interagit avec les protéines du milieu biologique, qui s'adsorbent progressivement à sa surface pour former une couronne protéique. Cette dernière influence les interactions avec la membrane cellulaire et peut favoriser l'internalisation de la particule. *Reproduite de Schöttler et al. (2016).*

Cette couronne modifie leurs propriétés physico-chimiques initiales et influence fortement leur stabilité colloïdale, leur biodistribution ainsi que leurs interactions avec les cellules de l'organisme (Kopac 2021; Schöttler, Landfester, and Mailänder 2016). La stabilité colloïdale correspond ici à la capacité des systèmes à rester dispersés en suspension sans agrégation ni précipitation (Garcia-Garcia et al. 2005). Sa diminution peut ainsi entraîner une perte de fonctionnalité des systèmes, en compromettant leur comportement *in vivo*. Selon sa composition, cette couronne peut notamment contenir des protéines impliquées dans la reconnaissance immunitaire, telles que les opsonines. Celles-ci favorisent la reconnaissance des particules exogènes par les cellules phagocytaires, principalement les macrophages (Walkey and Chan 2012). Les systèmes sont alors captés par les principaux organes de clairance, notamment le foie, la rate et, dans certains cas, les reins, ce qui réduit significativement la fraction de dose atteignant le site d'intérêt et constitue l'un des principaux verrous de la délivrance systémique (Behzadi et al. 2017; Saha and Saso 2023; Walkey and

Chan 2012). Ce phénomène peut également conduire à une accumulation et à une toxicité au niveau de ces organes de détoxification, comme illustré par la doxorubicine liposomale pégylée (Doxil®), dont la biodistribution est fortement influencée par la couronne protéique et la clairance immunitaire (Hadjidemetriou, Al-Ahmady, and Kostarelos 2016).

Dans ce contexte, le ciblage actif (**Figure 3**) a été développé pour améliorer la sélectivité d'interaction avec les cellules cibles (Peer et al. 2007). Il repose sur la fonctionnalisation des systèmes par des ligands spécifiques capables de reconnaître des récepteurs surexprimés à la surface cellulaire. Cette reconnaissance renforce les interactions système-cellule et peut conduire à différents comportements biologiques. Une fois liés aux cellules cibles, les systèmes peuvent adopter plusieurs mécanismes d'interaction **(Figure 3**): (i) libérer leur contenu juste à côté des cellules cibles, (ii) se fixer à la membrane plasmique et libérer leur contenu de manière retardée à l'extérieur de la cellule, ou (iii) être internalisées par la cellule, notamment via des mécanismes d'endocytose (Peer et al. 2007). Cependant, plusieurs études ont montré que le ciblage actif augmente l'internalisation cellulaire sans entrainer d'augmentation significative de l'accumulation au site cible. Ainsi, malgré la présence de ligands de ciblage, moins de 1 % de la dose injectée atteint vraiment la cible, soulignant que le principal verrou reste l'acheminement des systèmes jusqu'au tissu d'intérêt plutôt que leur interaction avec les cellules cibles (Wilhelm et al. 2016).

Ces observations mettent en évidence la nécessité de concevoir des systèmes de délivrance ciblée dont les propriétés physico-chimiques et leur architecture sont optimisées pour maximiser leur efficacité *in vivo*.

1.2.3. Paramètres de conception des systèmes de délivrance

Cahier des charges pour un systèmes de délivrance idéal

Pour envisager une application clinique efficace, les systèmes de délivrance doivent répondre à plusieurs critères fondamentaux.

La biocompatibilité correspond à la capacité d'un matériau ou d'un système à interagir avec un organisme vivant sans provoquer d'effets toxiques ou de réponse immunitaire excessive. Elle constitue un prérequis indispensable à toute application clinique en garantissant une tolérance compatible avec son utilisation thérapeutique (Peer et al. 2007).

La stabilité en milieu biologique désigne la capacité du système à conserver son intégrité structurale et fonctionnelle en conditions physiologiques, notamment face aux interactions avec les protéines plasmatiques, aux variations de pH et aux processus d'élimination. Cette stabilité influence directement la biodisponibilité, en déterminant la fraction du système capable d'atteindre la circulation systémique puis le site d'action sans dégradation prématurée ou capture par les organes de clairance, le foie, la rate et les reins (Peer et al. 2007).

La capacité de chargement du système de délivrance en molécules actives constitue aussi un paramètre clé, en particulier pour les molécules hydrophobes, instables ou nécessitant une libération prolongée, pour garantir une efficacité thérapeutique optimale (Peer et al. 2007).

Enfin, le contrôle de la libération représente aussi un enjeu important. Il désigne la possibilité de moduler la cinétique, la localisation et parfois même le moment de libération du principe actif. Ce contrôle est essentiel à la fois pour optimiser l'efficacité thérapeutique et pour limiter les effets secondaires, en maintenant la concentration du médicament dans la fenêtre thérapeutique et en évitant les phases de sous-dosage ou de toxicité (Farokhzad and Langer 2009; Siegel and Rathbone 2012). Le contrôle de la libération représente ainsi un paramètre central de conception, permettant d'ajuster l'exposition du patient au traitement de manière plus précise. Différents profils de libération peuvent être envisagés (**Figure 5**).

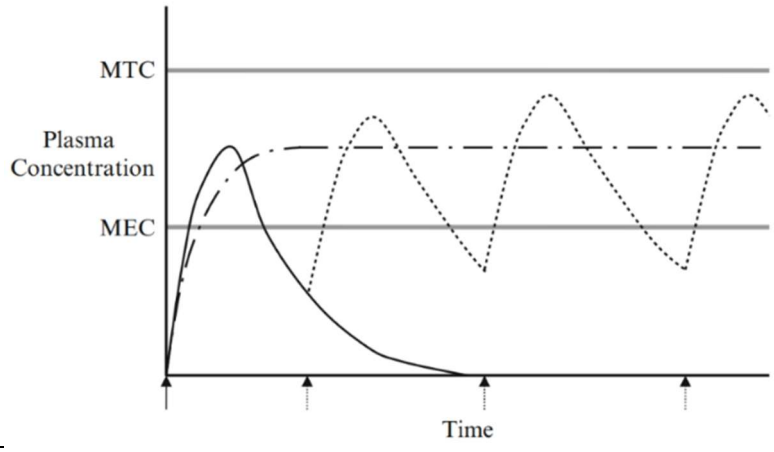


Figure 5. Evolution de la concentration plasmatique d'un médicament selon différents modes d'administration.
Comparaison de l'évolution de la concentration plasmatique après une administration unique (ligne pleine), des administrations répétées à intervalles réguliers (ligne pointillée) ou une libération à débit constant (ligne tiret-point). La fenêtre thérapeutique est délimitée par la concentration minimale efficace (*minimum effective concentration*, MEC) et la concentration minimale toxique (*minimum toxic concentration*, MTC). *Reproduite de Farokhzad and Langer (2009).*

Une libération à débit constant permet d'obtenir des concentrations plasmatiques relativement stables au cours du temps, tandis qu'une dose unique conventionnelle entraîne une hausse rapide de la concentration suivie d'une diminution progressive, avec un risque de sous-exposition et de toxicité. Des doses répétées réduisent ces variations, mais n'éliminent pas complètement les fluctuations de concentration au cours du temps (Farokhzad and Langer 2009). Ainsi, l'objectif principal des systèmes de délivrance ne repose pas sur la recherche d'un profil cinétique unique, mais sur la capacité à contrôler et adapter la libération du principe actif pour obtenir une exposition thérapeutique optimale et durable. Le contrôle de la cinétique de libération constitue une propriété recherchée pour les systèmes de délivrance développés dans le cadre de cette thèse.

Paramètres physico-chimiques et structuraux des systèmes de délivrance

Afin de répondre à ces critères, les systèmes de délivrance sont conçus en optimisant plusieurs paramètres physico-chimiques et structuraux (**Figure 6**).

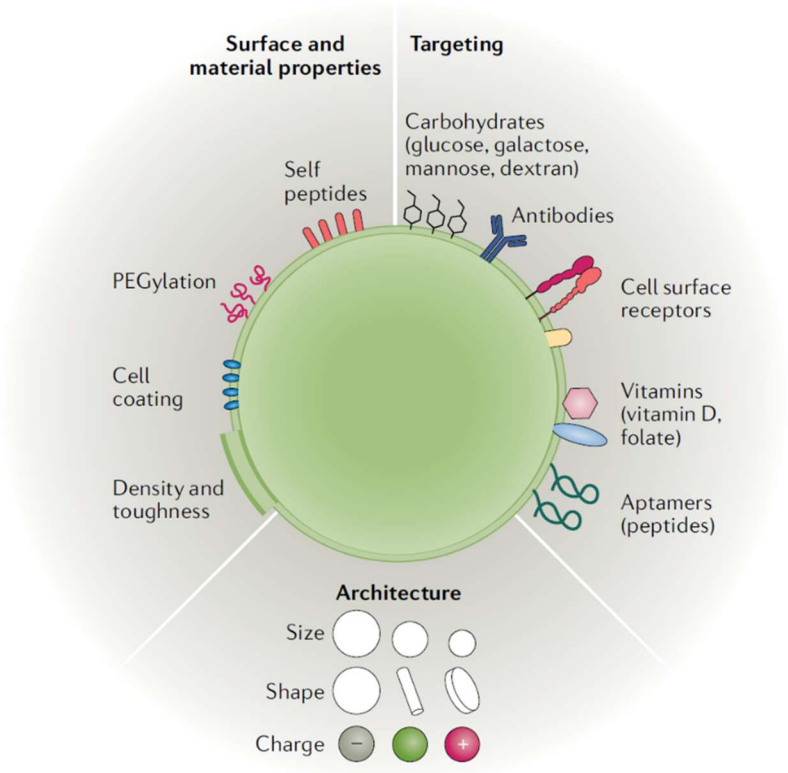


Figure 6. Optimisation des systèmes de délivrance.
Exemples de propriétés physico-chimiques et structurales des systèmes de délivrance pouvant être ajustées lors de la conception, notamment l'architecture, la chimie de surface et les stratégies de ciblage. *Adaptée de Mitchell et al. (2020).*

Parmi ces paramètres, la taille, la morphologie et la chimie de surface jouent un rôle central dans les interactions avec les milieux biologiques, bien que leurs effets soient fortement interdépendants et dépendants du contexte expérimental(Saha and Saso 2023; Seleci et al. 2016).

Taille et morphologie

La taille constitue l'un des principaux paramètres influençant le devenir *in vivo* des systèmes de délivrance (Banerjee et al. 2016; Blanco, Shen, and Ferrari 2015). Elle conditionne notamment leur biodistribution, leur clairance, leur pénétration tissulaire et leurs interactions cellulaires. Les systèmes de petite taille diffusent plus facilement dans les tissus et interagissent plus efficacement avec les cellules, ce qui peut être un avantage ou non, selon le contexte pathologique. A l'inverse, les systèmes de plus grande taille sont plus facilement captés et éliminés par les organes de détoxification, notamment le foie et la rate (Blanco, Shen, and Ferrari 2015). Par ailleurs, la taille influence également les phénomènes de transport et d'interaction cellulaire, notamment via la surface spécifique disponible (Behzadi et al. 2017; Saha and Saso 2023).

Par ailleurs, la morphologie influence directement les mécanismes d'interaction avec les cellules. Les systèmes sphériques sont généralement internalisés plus rapidement que ceux cubiques ou allongés, en raison d'une énergie de courbure favorable à l'initiation de l'endocytose. A l'inverse, les morphologies non sphériques peuvent présenter des cinétiques d'internalisation variables selon leur orientation et leur interaction avec la membrane cellulaire (Seleci et al. 2016).

Cependant, l'influence de la taille et de la morphologie reste fortement dépendante du contexte physiopathologique. Certaines études rapportent une internationalisation préférentielle des particules de petite taille, tandis que d'autres observent des tendances inverses selon les modèles cellulaires (Lu et al. 2007; Saha and Saso 2023). De la même manière, bien que la morphologie sphérique soit souvent associée à une internalisation plus rapide dans certains modèles, d'autres travaux montrent une efficacité comparable voie supérieure pour des morphologies allongées, soulignant la nature non universelle de ces effets (Saha and Saso 2023; Seleci et al. 2016). Dans ce contexte, la chimie de surface constitue un second levier majeur de conception, permettant d'ajuster finement ces interactions et d'optimiser le comportement biologique des systèmes.

Chimie de surface

Au-delà des paramètres structuraux, la chimie de surface constitue un levier essentiel de conception des systèmes de délivrance pour optimiser leur comportement *in* vivo (Behzadi et al. 2017). L'adsorption des protéines à la surface des systèmes se produit généralement après leur administration et résulte d'interactions physique et chimiques, notamment hydrophobes et électrostatiques, les interactions hydrophobes étant généralement considérées comme prépondérantes (**Figure 7**).

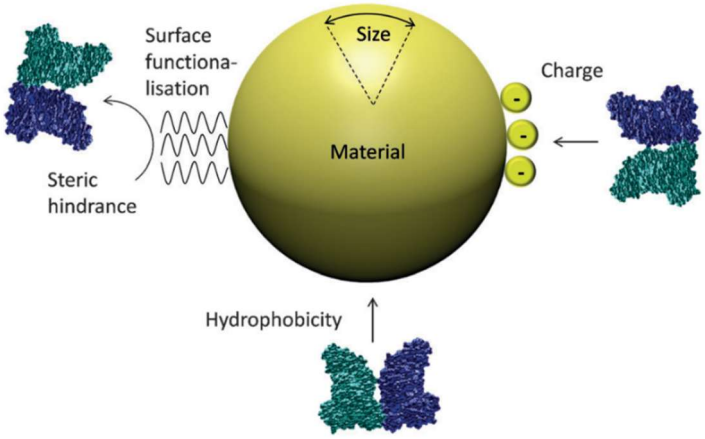


Figure 7. Interactions protéines-systèmes de délivrance.
Forces d'interaction impliquées dans l'adsorption des protéines sur les systèmes de délivrance, avec une contribution dominante des interactions hydrophobes. *Reproduite de Schöttler et al. (2016).*

Cette adsorption modifie la surface effective des systèmes en masquant les ligands de ciblage et conditionne leur reconnaissance et leur élimination par les systèmes phagocytaires. Elle peut être modulée par la fonctionnalisation de surface avec des polymères hydrophiles tels que le poly(éthylène glycol) (PEG). L'ajout de PEG génère à la fois une couche fortement hydratée et un encombrement stérique à l'interface système-milieu biologique. Ces effets combinés permettent de réduire l'adsorption non spécifique des protéines plasmatiques, telles que les opsonines, limitant ainsi la reconnaissance par le système phagocytaire, ce qui contribue à améliorer la stabilité colloïdale des systèmes de délivrance et à prolonger leur temps de circulation (**Figure 8**). (Schöttler, Landfester, and Mailänder 2016).

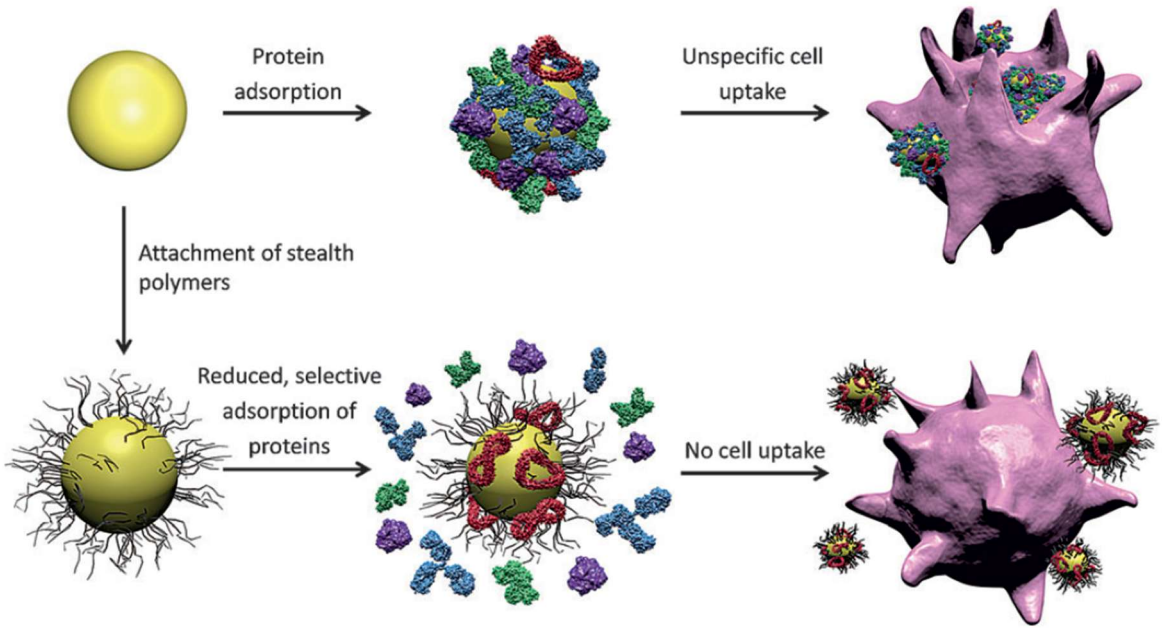


Figure 8. Fonctionnalisation de surface des systèmes de délivrance.
Influence de la fonctionnalisation de surface, notamment par le poly(éthylène glycol) (PEG), sur l'adsorption protéique et la reconnaissance immunitaire des systèmes de délivrance. *Reproduite de Schöttler et al. (2016).*

Par ailleurs, la surfaces des systèmes peut être fonctionnalisée par des ligands de ciblage tels que des protéines, peptides, aptamères ou anticorps, permettant une reconnaissance spécifique de cibles surexprimés à la surface cellulaire (Seleci et al. 2016).

Enfin, la charge de surface, caractérisée par le potentiel zêta, influence fortement les interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires et la stabilité colloïdale des systèmes (Yue et al. 2011). Des valeurs supérieures à + 30 mV ou inférieures à – 30 mV sont généralement associées à une bonne stabilité colloïdale (Seleci et al. 2016). En raison de la charge négative des membranes cellulaires, les systèmes chargés positivement présentent généralement une internalisation cellulaire plus efficace que les systèmes neutres ou négatifs (Seleci et al. 2016). Cependant, une charge cationique favorise l'internalisation mais entraîne aussi une élimination plus rapide par le système mononucléé phagocytaire. Ainsi, une charge neutre ou légèrement négative est généralement préférable pour prolonger le temps de circulation, tandis qu'une charge positive peut être utile une fois le système arrivé au site cible (Blanco, Shen, and Ferrari 2015).

Architecture et diversité des systèmes

Basé sur ces paramètres de conception, une grande diversité de systèmes de délivrance a été développée en nanomédecine pour répondre à des applications thérapeutiques variées (**Figure 9**). Ces systèmes peuvent être constitués de lipides, de polymères, de matériaux inorganiques ou encore de structures biologiques inspirées du vivant, chacune avec des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles spécifiques (Mitchell et al. 2021).

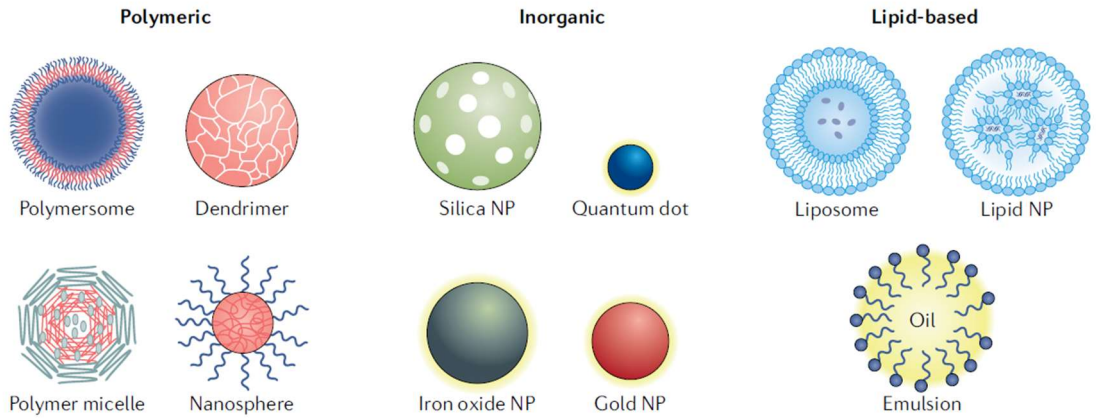


Figure 9. Principales classes de systèmes de délivrance utilisés en nanomédecine.
Les liposomes et les polymersomes sont des systèmes compartimentés présentant une cavité centrale aqueuses, tandis que les autres systèmes représentés correspondent à des structures non compartimentées. *Adaptée de Mitchell et al. (2020).*

De manière générale, leur architecture peut être distinguée selon la présence ou non d'un compartiment interne structuré (Palivan et al. 2024). On distingue ainsi les systèmes non compartimentés, également qualifiés de systèmes matriciels, dans lesquels les molécules actives sont dispersées de façon homogène au sein d'une matrice polymérique, lipidique ou inorganique (Seleci et al. 2016). Ces systèmes incluent notamment les nanosphères polymériques, qui correspondent à des particules sans structure de type réservoir, dans lesquelles la molécule d'intérêt est dispersée au sein de la matrice polymérique (Jung et al. 2007) ; les nanoparticules lipidique solides, formées de lipide solides à température physiologique permettant l'incorporation de composés hydrophobes au sein d'une phase lipidique cristalline ou partiellement désorganisée (Ganesan et al. 2018) ; ainsi que certaines nanoparticules inorganiques poreuses, telles que la silice mésoporeuse, caractérisées par une structure hautement organisée de pores permettant une grande capacité de chargement et

une diffusion contrôlée des molécules encapsulées (Kankala et al. 2020; Manzano and Vallet-Regí 2019).

A l'inverse, les systèmes compartimentés, également qualifiés de systèmes vésiculaires, présentent une architecture délimitant un cœur interne séparé du milieu extérieur par une membrane structurée. Cette organisation permet l'encapsulation de composés de nature hydrophile dans le cœur aqueux et de composés hydrophobes au sein de la membrane, offrant ainsi une double capacité de vectorisation. Ces systèmes constituent une classe importante de vecteurs en nanomédecine et une base solide pour le développement de systèmes polymériques avancés (Palivan et al. 2024). Ces systèmes seront abordés plus en détail dans le paragraphe suivant, car le système développé étudié dans ce travail est un système compartimenté.

1.3. SYSTEMES VESICULAIRES BIOMIMETIQUES POUR LA DELIVRANCE CIBLEE DE MEDICAMENTS

1.3.1. Membranes biologiques et autoassemblage amphiphile

Les systèmes vésiculaires biomimétiques s'inspirent de l'organisation compartimentée des cellules vivantes, basée sur des membranes lipidiques assurant à la fois la séparation des compartiments et le contrôle des échanges avec le milieu biologique (Palivan et al. 2024). Ce principe de compartimentation est fondamental dans les systèmes biologiques, qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes, et conditionne la protection du matériel génétique, la régulation des processus biochimiques et l'efficacité des réactions cellulaires (Behzadi et al. 2017; Marguet, Bonduelle, and Lecommandoux 2012). Cette organisation est assurée par une membrane plasmique, formée principalement de phospholipides organisés en bicouche grâce à leur nature amphiphile (Behzadi et al. 2017). Elle est associée à diverses biomolécules, comme les protéines de transport, assurant les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, les enzymes ou les glucides, ayant un rôle d'agent de reconnaissance et de structuration (**Figure 10**) (Rideau et al. 2018). A l'intérieur de la cellule, de nombreux organites sont également délimités par des membranes en bicouche lipidique (Rideau et al. 2018). Depuis quelques années, les vésicules extracellulaires sont également très étudiées. Ce sont des objets nanométriques émis par les cellules, circulant dans l'organisme, et dont la composition membranaire et le contenu reflètent leur cellule ou organite d'origine (Boireau and Elie-Caille 2021). En tant que transporteurs naturels de biomolécules, elles constituent

également des modèles pertinents pour le développement de systèmes de délivrance biomimétiques (Aubertin et al. 2021).

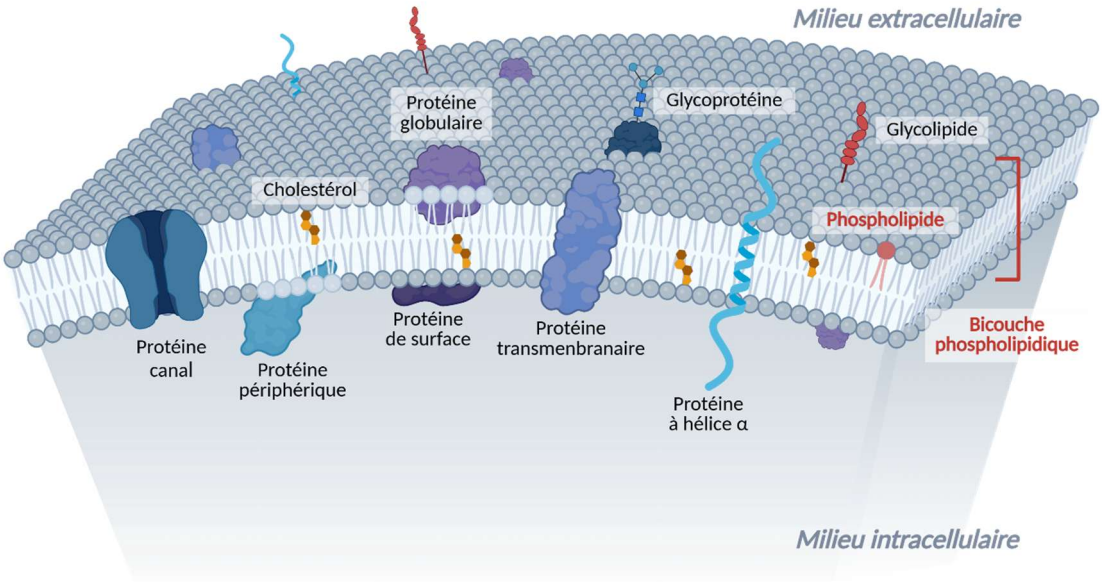


Figure 10. Structure schématique d'une membrane biologique.
Adaptée de BioRender.com.

Pour mieux comprendre ces systèmes, des modèles simplifiés de membranes cellulaires ont été développés au fil des années à partir de molécules amphiphiles. On retrouve une grande variété de molécules amphiphiles, parmi lesquelles les lipides et les copolymères amphiphiles occupent une place importante (**Figure 11**). Ces molécules possèdent une partie hydrophile et une partie hydrophobe, leur permettant de s'organiser spontanément en solution aqueuse en structures supramoléculaires organisées. Cet autoassemblage suit les principes thermodynamiques pour minimiser l'énergie libre du système : les chaînes hydrophobes s'associent pour éviter leur exposition à l'eau, tandis que les chaînes hydrophiles interagissent avec le milieu aqueux, conduisant à la formation de structures globalement stables.

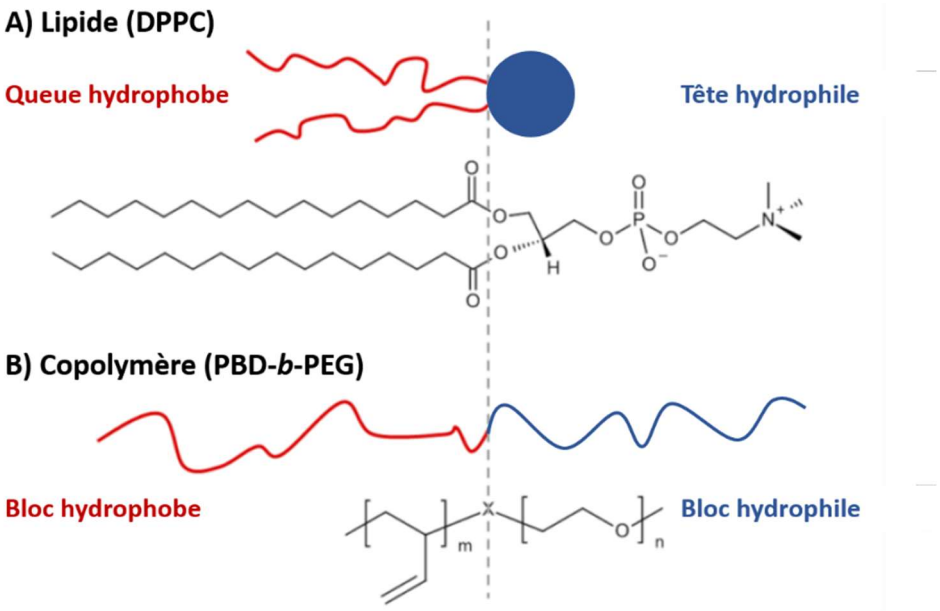


Figure 11. Représentation schématique et détaillée des parties hydrophiles et hydrophobes de deux sortes de molécules amphiphiles.
(A) Le lipide DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine), phospholipide saturé utilisé dans les systèmes lipidiques. **(B)** Le copolymère à blocs PBD_m-*b*-PEG_n, constitué d'un bloc hydrophobe poly(butadiène) et d'un bloc hydrophile poly(éthylène glycol), représentatif des copolymères amphiphiles utilisés pour la formation de systèmes vésiculaires polymériques et décrit plus en détail dans la section dédiée aux polymersomes.

Les systèmes vésiculaires biomimétiques présentent un intérêt particulier pour la délivrance ciblée de médicaments en raison de leur capacité à encapsuler simultanément des molécules hydrophiles au sein du compartiment aqueux et des composés hydrophobes dans leur membrane. Cette double capacité de chargement, associée à leur proximité structurale avec les membranes biologiques, explique leur intérêt majeur en nanomédecine (Rideau et al. 2018). Selon leur organisation membranaire et leur taille, ces systèmes peuvent néanmoins adopter différentes architectures vésiculaires.

1.3.2. Architecture et organisation des systèmes vésiculaires biomimétiques

Les systèmes vésiculaires peuvent être classées selon leur organisation membranaire et leur taille, indépendamment de leur composition lipidique ou polymérique, comme illustré dans la **Figure 12** (Moghassemi and Hadjizadeh 2014a; Rideau et al. 2018; van Swaay and deMello 2013). Les systèmes possédant une seule bicouche sont appelés unilamellaires et sont subdivisés en petites vésicules unilamellaires (*Small Unilamellar Vesicles*, SUV, < 100 nm), grandes vésicules unilamellaires (*Large Unilamellar Vesicles*, LUV, 100nm-1 µm) et vésicules unilamellaires géantes (*Giant Unilamellar Vesicles,* GUV, > 1 µm). Les vésicules qui possèdent

plusieurs bicouches concentriques sont appelés vésicules multilamellaires (*Multilamellar Vesicles,* MLV). Lorsqu'elles contiennent des compartiments internes, elles sont appelées vésicules multivésiculaires (*Multivesicular Vesicles*, MVV).

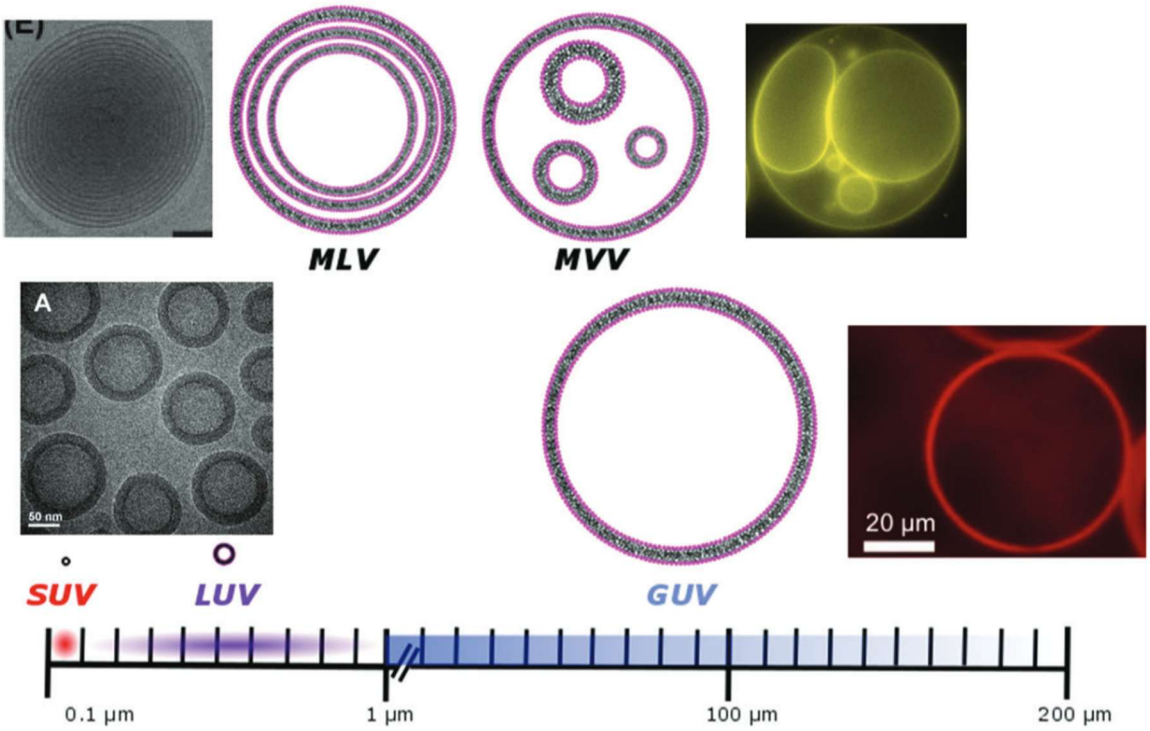


Figure 12. Représentation schématique de la classification des vésicules.
Les vésicules unilamellaires sont classées selon leur taille : petites (SUV), grandes (LUV) et géantes (GUV). Les vésicules non unilamellaires peuvent être soit multilamellaires (MLV), soit multivésiculaires (MVV), indépendamment de leur taille. *Adaptée de Rideau et al. (2018).*

Parmi ces systèmes, les vésicules formées à partir de lipides naturels constituent les premiers modèles biomimétiques développés en nanomédecine, appelés liposomes, qui ont joué un rôle central dans le développement des systèmes de délivrance vésiculaire.

1.3.3. Liposomes : premiers systèmes vésiculaires biomimétiques

Les liposomes constituent les premiers systèmes biomimétiques, découverts par Alex Bangham dans les années 1960. Ils demeurent les plus largement étudiés en nanomédecine. Ils sont constitués d'une bicouche phospholipidique qui délimite un compartiment aqueux interne. Ils se forment spontanément en milieu aqueux par autoassemblage de phospholipides amphiphiles, sous l'effet des interactions hydrophobes et hydrophiles gouvernant l'organisation membranaire (Sercombe et al. 2015). Cette organisation, inspirée

des membranes biologiques, a rapidement permis d'envisager leur utilisation comme vecteurs de composés thérapeutiques.

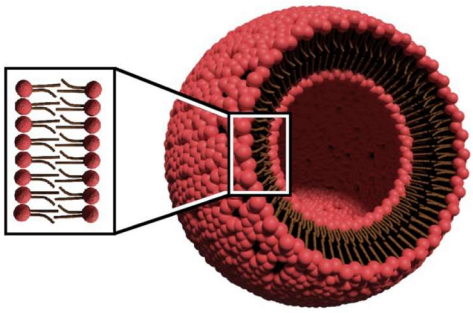


Figure 13. Représentation schématique d'un liposome.
Encadré : représentation schématique de l'organisation en bicouche des lipides formant la membrane. *Reproduite d'une figure issue de la thèse de Fauquignon Martin, Université de Bordeaux, 2020.*

Leur intérêt clinique est notamment illustré par plusieurs formulations liposomales approuvées en oncologie. Doxil®, première formulation liposomale approuvée, constitue un exemple historique majeur dans le traitement de certains cancers solides, dans lequel la doxorubicine encapsulée dans des liposomes PEGylés présente une pharmacocinétique modifiée, avec un allongement du temps de circulation et une amélioration de l'index thérapeutique (Barenholz 2012; Kamaly et al. 2012). Plus récemment, Vyxeos® (daunorubicine/cytarabine liposomales, 2017), indiqué dans certaines leucémies aiguës myéloïdes, illustre la poursuite du développement clinique des systèmes liposomaux.

Malgré leur succès clinique, les liposomes présentent plusieurs limites liées à la nature lipidique de leur membrane. Leur stabilité, leur capacité de rétention et leur comportement en milieu biologique peuvent être influencés par la composition lipidique ainsi que par les interactions avec les composants de l'environnement physiologique (Le Meins, Sandre, and Lecommandoux 2011; Pande 2023; Rideau et al. 2018; Sercombe et al. 2015). En effet en milieu biologique, ils interagissent et fusionnent très facilement avec les membranes biologiques ce qui peut réduire le contrôle de la libération des molécules encapsulées. Différentes stratégies d'optimisation ont été développées pour améliorer les performances des liposomes, notamment l'incorporation de cholestérol pour moduler la fluidité et la perméabilité membranaire, la PEGylation pour prolonger le temps de circulation sanguine, ou l'utilisation de lipides synthétiques plus stables (Allen and Cullis 2013). Cependant, ces limites

ont stimulé la recherche de systèmes vésiculaires alternatifs offrant une plus grande flexibilité de conception.

Dans ce contexte, les polymersomes, constitués de copolymères amphiphiles autoassemblés, ont émergé comme une alternative prometteuse. Inspirés des liposomes tout en bénéficiant de la polyvalence des polymères synthétiques, ils offrent un large éventail de propriétés ajustables. Les différences structurelles et fonctionnelles entre ces deux systèmes seront détaillées dans la section **1.4.4**. Les polymersomes ont été choisis comme système de délivrance pour ce projet.

1.4. POLYMERSOMES : VESICULES POLYMERIQUES POUR LA DELIVRANCE CIBLEE

L'étude des copolymères amphiphiles en solution aqueuse a conduit, à partir de 1995, à l'émergence de structures vésiculaires analogues aux liposomes, mais formées à partir de chaînes polymères (**Figure 14**).

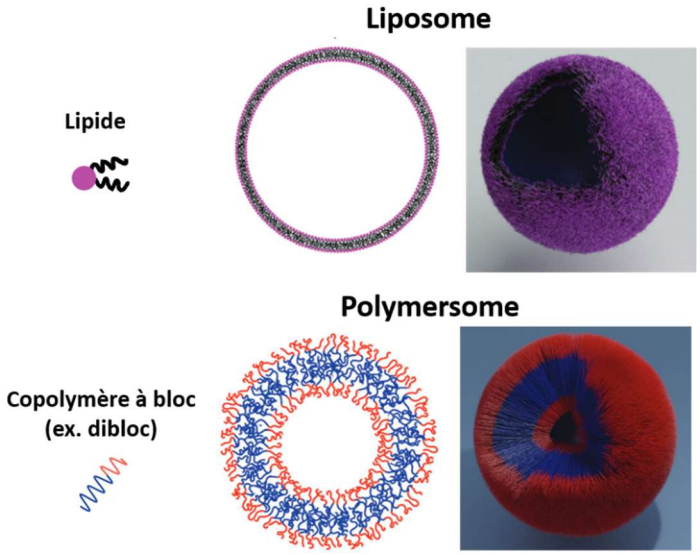


Figure 14. Représentation des sous-unités constitutives et des structures 2D et 3D des liposomes et des polymersomes.
Adaptée de Rideau et al. (2018).

En chimie des polymères, un polymère est une macromolécule constituée de l'enchaînement covalent d'unités monomériques, dont les propriétés physico-chimiques peuvent être modulées par la nature chimique des monomères, la longueur des chaînes ou leur architecture. Dans le cas des copolymères à blocs amphiphiles, ces macromolécules

comportent au moins un segment hydrophile et un segment hydrophobe, leur conférant des propriétés d'autoassemblage spontanée en milieu aqueux, tout comme les lipides.

Ces structures ont été initialement observées par Eisenberg *et al.*, qui ont mis en évidence la formation de vésicules de morphologies variées en solution aqueuse à partir d'un copolymère amphiphile de composition variable, le poly(styrène)-*b*-poly(acide acrylique) (PS_m-*b*-PAA_n), où m et n correspondent respectivement aux degrés de polymérisation des blocs hydrophobes et hydrophiles, et b indiquant une architecture de copolymère à blocs dans laquelle deux segments polymériques distincts sont liés de manière covalente (**Figure 15**). Ces travaux montrent qu'une augmentation de la longueur du bloc hydrophobe favorise la formation de vésicules à bicouches stables, en raison de l'augmentation de l'épaisseur membranaire (lié au paramètre d'empilement ; voire **1.4.2**). (Mai and Eisenberg 2012; L. Zhang and Eisenberg 1995).

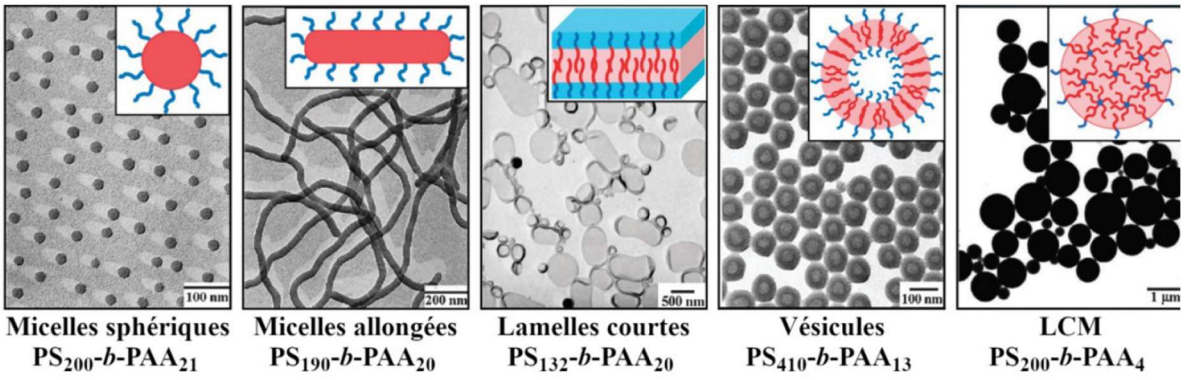


Figure 15. Différentes morphologies d'objets à partir de copolymère amphiphile.
Micrographies en microscopie électronique en transmission (MET) et représentations schématiques des différentes morphologies obtenues à partir de copolymère amphiphile poly(styrène)-b-poly(acide acrylique) (PSm-b-PAAn). Selon la longueur relative des blocs hydrophobes (PS, en rouge) et hydrophiles (PAA, en bleu), ces copolymères peuvent former différentes structures supramoléculaires, incluant des micelles, des agrégats complexes et des vésicules. *Reproduite de Mai and Eisenberg (2012).*

Le terme « polymersome » a ensuite été introduit par Discher *et al.* en 1999 pour décrire ces vésicules polymériques morphologiquement analogues aux liposomes. Ils ont notamment démontré la formation de vésicules stables à partir de copolymères de type poly(éthylène oxyde)-*b*-poly(éthylethylène) (PEO-*b*-PEE), ouvrant la voie à leur utilisation comme systèmes de délivrance de médicaments (B. M. Discher et al. 1999).

Les polymersomes sont donc des objets très récents et ils suscitent un intérêt croissant en nanomédecine, grâce à leur stabilité colloïdale, leur capacité d'encapsulation et leur grande polyvalence chimique. Les propriétés de ces systèmes reposent directement sur

l'autoassemblage des copolymères à blocs amphiphiles, qui détermine la formation, la morphologie et l'organisation des structures en milieu aqueux.

1.4.1. Copolymères à blocs : définition et architecture

Comme mentionné précédemment, les copolymères à blocs sont une famille majeure de molécules amphiphiles utilisées pour la formation de systèmes vésiculaires polymériques. Contrairement aux homopolymères, constitués de la répétition d'un seul type de monomère, les copolymères à blocs sont composés de segments polymériques chimiquement distincts reliés de manière covalente au seine d'une même chaîne macromoléculaire (Bates and Fredrickson 1999; Mai and Eisenberg 2012).

Notre étude se concentre spécifiquement sur les copolymères à blocs linéaires de type A-*b*-B, illustré schématiquement dans la **Figure 11,** où A correspond au bloc hydrophobe et B au bloc hydrophile, le symbole « *b* » désignant une architecture de type copolymère à blocs. Cette architecture permet d'associer au sein d'une même macromolécule des segments polymériques de nature différente. L'association de blocs hydrophiles et hydrophobes leur confère un caractère amphiphile à l'origine de leur autoassemblage spontané en milieu aqueux, pouvant conduire à la formation de différentes structures supramoléculaires, dont les polymersomes.

Au-delà de leur capacité d'autoassemblage, la nature entièrement synthétique des copolymères à blocs permet un contrôle précis de paramètres comme la masse molaire, la composition chimique ou la longueur relative des blocs, lesquels déterminent directement la structure des assemblages en solution (Lim Soo and Eisenberg 2004). La modulation de ces paramètres permet notamment d'ajuster les propriétés mécaniques, l'épaisseur membranaire et la perméabilité des polymersomes (Lim Soo and Eisenberg 2004; Rideau et al. 2018). De plus, la synthèse chimique de ces copolymères offre la possibilité d'introduire différents groupes fonctionnels au niveau des chaînes polymériques. La maîtrise de ces paramètres moléculaires et structuraux est donc essentielle pour contrôler l'autoassemblage, la morphologie et les propriétés de surface des structures formées en solution aqueuse (LoPresti et al. 2009).

1.4.2. Autoassemblage des copolymères amphiphiles

Paramètre d'empilement (Pc)

En solution aqueuse, les blocs hydrophobes du copolymère s'assemblent pour minimiser leur contact avec l'eau, tandis que les blocs hydrophiles interagissent favorablement avec le milieu aqueux. Cet équilibre entre forces thermodynamiques et entropiques conduit à l'autoassemblage des copolymères en différentes structures comme des micelles, des lamelles ou des vésicules, dont la morphologie finale est déterminée par le paramètre d'empilement (Pc) :

Équation 1

$$P_c = \frac{\nu_c}{a_0 . l_c}$$

où ν_c correspond au volume du bloc hydrophobe, a_0 à l'aire occupée par le bloc hydrophile, et l_c à la longueur de la chaîne hydrophobe. Lorsque le bloc hydrophile est majoritaire, les copolymères tendent à former des structures fortement courbées, telles que des micelles sphériques. A l'inverse, l'augmentation du bloc hydrophobe réduit progressivement cette courbure et favorise la formation de micelles cylindriques, puis des bicouches susceptibles de se refermer en vésicules, appelées polymersomes (**Figure 16**). Comme illustré par la **Figure 16**, les polymersomes présentent généralement une valeur de Pc comprise entre ½ et 1 (Blanazs, Armes, and Ryan 2009; Israelachvili, Mitchell, and Ninham 1976; Moghassemi and Hadjizadeh 2014b).

Fraction hydrophile (f_H)

La géométrie de l'autoassemblage peut aussi être influencée par d'autres facteurs tels que la masse moléculaire, la température, la concentration du polymère ou la force ionique de la solution, qui modulent la thermodynamique et la cinétique du processus. Pour les copolymères à blocs, la prédiction des morphologies obtenues repose toutefois plus couramment sur la fraction massique hydrophile (f_H) que sur le paramètre d'empilement (Pc), définie comme le rapport entre la masse molaire (M) du bloc hydrophile et celle du copolymère total :

Équation 2

$$f_H = \frac{M_{bloc\ hydrophil}}{M_{copolymère}}$$

Sur la base d'études d'autoassemblage réalisées avec des copolymères de type poly(éthylène oxyde)-*b*-poly(butadiène) (PEO-*b*- PEO-) et poly(éthylène oxyde)-*b*-poly(éthylethylène) (PEO-*b*-PEE), Disher *et al.* ont proposé une relation empirique entre f_H et la morphologie des assemblages formés : des micelles sphérique pour f_H > 50%, des micelles cylindriques pour 40% < f_H < 50%, et des polymersomes pour 25% < f_H < 40% (**Figure 16**) (D. E. Discher and Ahmed 2006).

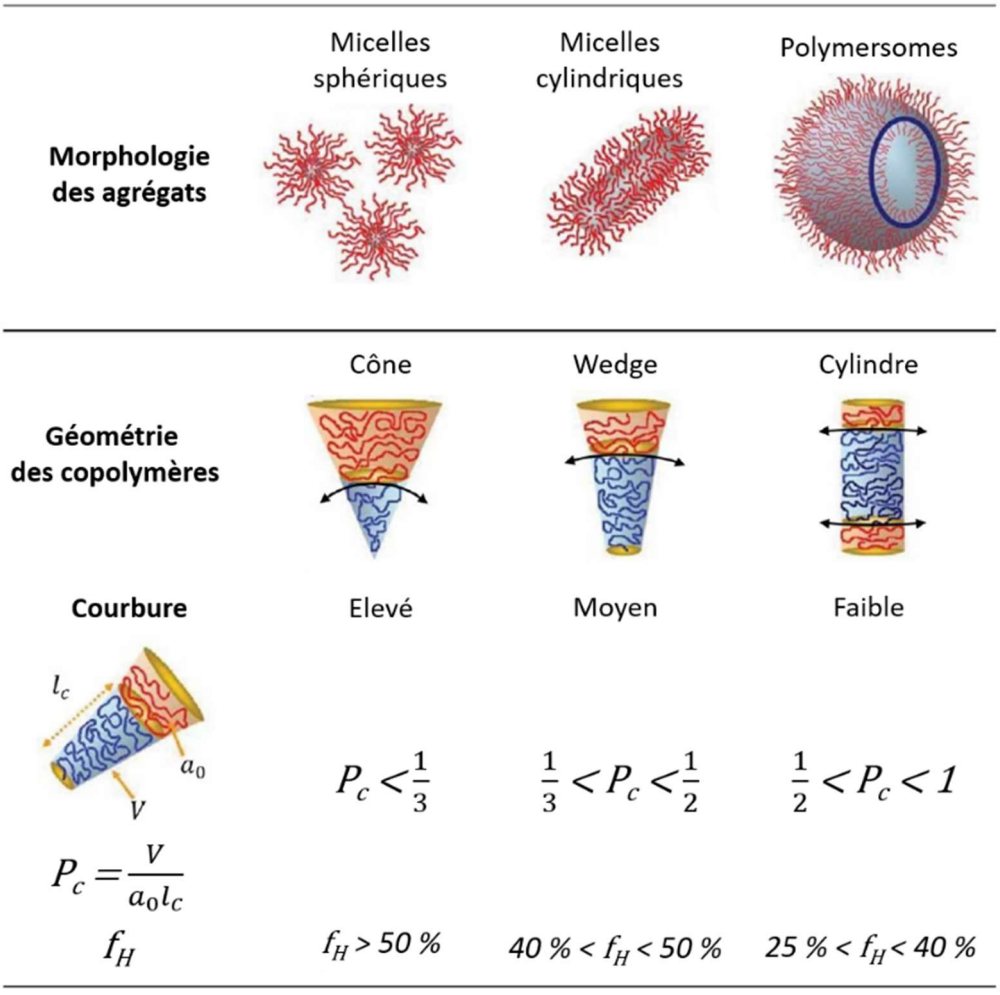


Figure 16. Schéma des différentes morphologies obtenues par autoassemblage de copolymères diblocs. La morphologie des assemblages dépend de la géométrie de l'amphiphile et peut être prédite à partir du paramètre d'empilement (P_c) ou de la fraction hydrophile (f_H) du copolymère (bloc hydrophile en rouge et bloc hydrophobe en bleu). L'augmentation relative de la fraction hydrophobe favorise une diminution de la courbure interfaciale et conduit successivement à la formation de micelles sphériques, de micelles cylindriques et de vésicules de type polymersomes. *Adaptée de Blanazs et al. (2009) et de Disher et Ahmed (2006).*

Cependant, ces intervalles ne constituent pas une règle universelle. Bien qu'une diminution de f_H favorise généralement la transition des micelles vers des structures vésiculaires, les domaines de stabilité des différentes morphologies dépendent fortement de la nature chimique des copolymères, de leur masse molaire, de leur architecture ainsi que des conditions d'autoassemblage utilisées. Par exemple, certains copolymères comportant des blocs hydrophobes biodégradables, tels que le poly(acide lactique) (PLA) ou la poly(ε-caprolactone) (PCL), peuvent former des vésicules pour des valeurs f_H significativement plus faibles. De plus, cette approche reste principalement fondée sur des considérations thermodynamiques et ne prend pas pleinement en compte les effets cinétiques intervenant lors de l'autoassemblage. Ainsi, l'étude de l'autoassemblage d'un nouveau copolymère nécessite généralement une caractérisation expérimentale afin d'identifier les domaines morphologiques accessibles et les paramètres influençant les propriétés des structures obtenues.

1.4.3. Taille et organisation des polymersomes

Les polymersomes présentent une diversité d'organisations membranaires, comme décrites dans la section 1.3.2, allant de vésicules unilamellaires de taille nanométrique à des structures micrométriques plus complexes. Cette diversité architecturale dépend notamment des propriétés physico-chimiques des copolymères utilisés ainsi que des conditions d'autoassemblage.

Grâce à leur architecture compartimentée, les polymersomes permettent l'encapsulation de composés hydrophiles dans leur cœur aqueux et de molécules hydrophobes au sein de la membrane polymérique. Ils ont ainsi été étudiés pour le transport d'une grande variété de cargos, incluant des enzymes (Z. Li et al. 2026; Lea Messager et al. 2016; Spulber et al. 2014), des acides nucléiques tels que les ARN interférents (siRNA) et les oligonucléotides antisens (AON) (Y. Kim et al. 2009), des molécules bioactives (Fan et al. 2021; M. L. Lee et al. 2026) ainsi que des nanoparticules (Jaskiewicz et al. 2012). Au-delà de cette capacité d'encapsulation, les polymersomes peuvent également servir de compartiments confinés pour des systèmes réactionnels complexes (**Figure 17**). Leur perméabilité contrôlée permet en effet le développement de nanoréacteurs enzymatiques, dans lesquels les substrats diffusent sélectivement à travers la membrane, tandis que les enzymes restent

confinées (Klermund, Poschenrieder, and Castiglione 2017; Z. Li et al. 2026; Marguet, Bonduelle, and Lecommandoux 2012; Spulber et al. 2014). Dans cette optique, ils ont également été exploités comme organites artificiels capables de reproduire des réactions biochimiques compartimentées (Peters et al. 2014). Des architectures encore plus complexes peuvent être obtenues par hiérarchisation des compartiments via l'encapsulation de polymersomes au sein d'autres polymersomes, conduisant à des systèmes de type « polymersomes-in-polymersomes ». Ces structures multicompatimentées permettent d'envisager des stratégies de libération programmée et multi-étapes (S.-H. Kim et al. 2011). Ces propriétés font des polymersomes des plateformes pertinentes pour des applications biomimétiques et de délivrance contrôlée.

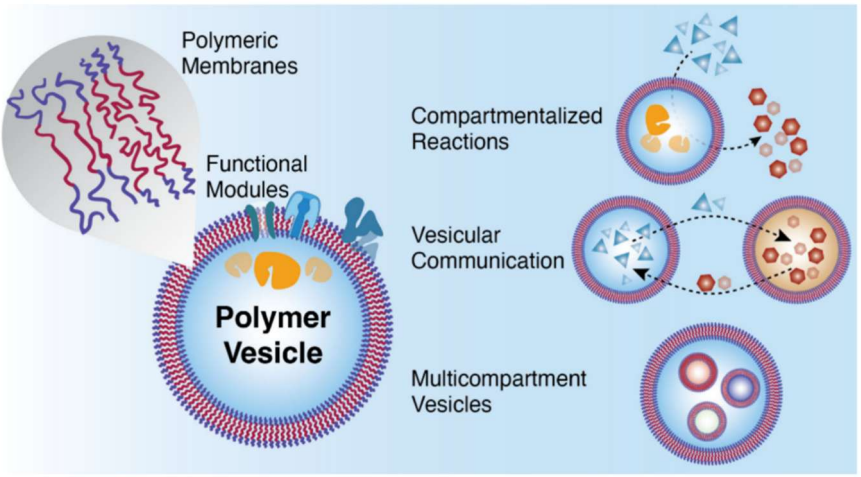


Figure 17. Vue d'ensemble des polymersomes et de leurs applications.
Les polymersomes sont constitués d'une membrane polymérique formée de copolymères diblocs amphiphiles. Leur fonctionnalisation peut être enrichie par l'ajout de modules fonctionnels tels que des pores membranaires ou des enzymes encapsulées. Ces systèmes peuvent être utilisés comme compartiments réactionnels pour des réactions biochimiques, comme plateformes de communication entre compartiments catalytiques, ou encore comme architectures multicompartimentées obtenues par encapsulation de polymersomes plus petite taille au sein de polymersomes plus grande taille. *Reproduite de Palivan et al. (2024).*

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéressons plus particulièrement aux polymersomes de type GUV, dont la taille micrométrique, généralement comprise entre 1 et 50 µm, est comparable à celle des cellules biologiques. Cette dimension facilite leur observation par microscopie optique et explique leur utilisation comme modèles biomimétiques membranaires. Ces systèmes permettent notamment d'étudier différents phénomènes associés aux membranes biologiques, tels que la déformation, l'adhésion, la

fusion, la fission, la formation de pores ou encore la rupture membranaire (Ghellab et al. 2019).

Au-delà de leur intérêt fondamental, les polymersomes GUV constituent également des systèmes de délivrance potentiels à l'échelle micrométrique. Leur architecture compartimentée permet l'encapsulation d'une large diversité de cargos, incluant des biomolécules, des nanoparticules ou des systèmes réactionnels complexes. Les performances d'encapsulation dépendent toutefois fortement des conditions de préparation, de la nature du copolymère et du type de cargo, avec des efficacités rapportées dans la littérature couvrant une large gamme de valeurs (Mertz and Castiglione 2021; Moquin et al. 2018; Parnell et al. 2009). Cette capacité de chargement ouvre la voie à des stratégies de délivrance locale adaptées à certaines applications thérapeutiques (Guo et al. 2025).

Dans une perspective plus large, ces systèmes peuvent aussi être adaptés vers des vésicules de plus petite taille, notamment à l'échelle nanométrique, en fonction des applications thérapeutiques visées.

Enfin, l'utilisation de ces systèmes s'inscrit dans la continuité des travaux menés au sein du laboratoire partenaire LCPO, où les polymersomes GUV sont largement utilisés comme systèmes de compartimentation. Leur capacité à encapsuler et à organiser différents composés en fait des outils privilégiés pour l'étude des propriétés physico-chimiques des membranes polymériques ainsi que la modélisation de systèmes biomimétiques complexes (Equy et al. 2025; S.-H. Kim et al. 2011; Pautot, Frisken, and Weitz 2003; Peyret, Ibarboure, Meins, et al. 2017; Peyret, Ibarboure, Tron, et al. 2017a).

1.4.4. Comparaison liposomes/polymersomes

Les liposomes et les polymersomes se distinguent surtout par la nature chimique de leur membrane, laquelle conditionne directement leurs propriétés structurales et fonctionnelles, comme résumé dans le **Tableau 1** et illustré en **Figure 18** (Léa Messager et al. 2014; Palivan et al. 2016; Rideau et al. 2018).

	Liposomes	Polymersomes
Module de courbure (kT) (résistance à la déformation par courbure)	11-30	40 – 460
Module d'étirement (mN/m) (résistance à l'augmentation de surface)	250 ± 2	80 – 100
Déformation à la lyse (%) (Déformation maximale avant rupture)	5	20 – 50
Viscosité de cisaillement de surface de la membrane (mN/ms) (Fluidité de la membrane)	10^{-5}	15 x 10^{-3}
Epaisseur de la membrane (nm)	3 – 5	10 – 50
Perméabilité à l'eau (µm/s) (capacité de l'eau à traverser la membrane)	15 – 50	0.7 – 10
Coefficient de diffusion latérale µm²/s) (mobilité des molécules dans la membrane)	3,8	0,12 – 0,0024

Tableau 1. Comparaison des principales propriétés membranaires des liposomes et polymersomes. *Adapté de Le Meins et al. (2011).*

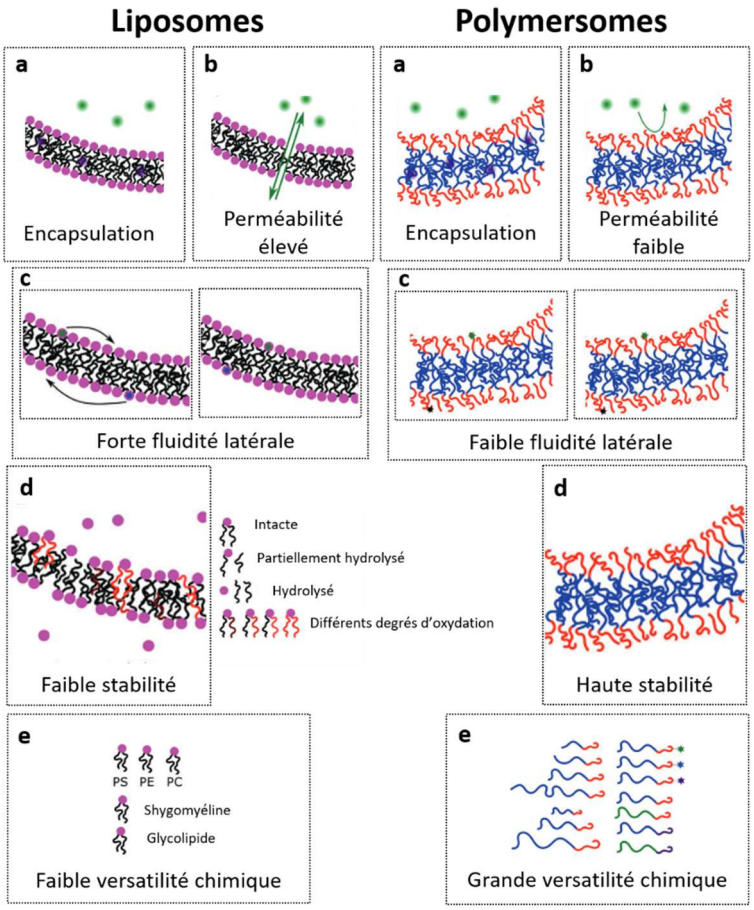


Figure 18. Représentation schématique des principales différences membranaires des liposomes et polymersomes.
Adaptée de Rideau et. (2018).

Dans les deux cas, ces systèmes reposent sur une organisation en bicouche amphiphile permettant l'encapsulation de molécules hydrophiles dans leur compartiment aqueux interne et de molécules hydrophobes au sein de la membrane (**Figure 18A**) (Rideau et al. 2018).

Les liposomes possèdent une bicouche lipidique fine, d'une épaisseur de 3 à 5 nm, caractérisée par une perméabilité relativement élevée aux petites molécules hydrophiles (**Figure 18B**) et une forte fluidité membranaire (**Figure 18C**). Cette fluidité, combinée à une composition proche de celle des membranes biologiques, contribue à leur excellente biocompatibilité. Néanmoins, elle s'accompagne d'une stabilité physico-chimique limitée et d'une faible rétention des molécules encapsulées. Leur stabilité dépend fortement de la composition lipidique et peut être affectée par des processus d'oxydation ou d'hydrolyse des chaînes lipidiques, entraînant une altération de leurs propriétés membranaires (**Figure 18D-E**) (Ganesan et al. 2018; Le Meins, Sandre, and Lecommandoux 2011).

A L'inverse, les polymersomes présentent des membranes plus épaisses (5-50 nm), issues de l'autoassemblage de copolymères à blocs de masse molaire élevée. Cette organisation se traduit par diminution marquée de la perméabilité membranaire (**Figure 18B**) ainsi que par une réduction importante de la fluidité latérale des chaînes polymériques (**Figure 18C**), conférant *in fine* à la membrane une rigidité accrue (Itel et al. 2014). Ces caractéristiques confèrent aux polymersomes une robustesse supérieure (**Figure 18D-E**), particulièrement adaptée aux applications de délivrance contrôlée (Le Meins, Sandre, and Lecommandoux 2011; Rideau et al. 2018). Cette faible perméabilité peut néanmoins constituer une limite pour certaines applications nécessitant des échanges rapides avec le milieu extérieur, telles que les systèmes de type nanoréacteurs, présentés dans la section précédente (**1.4.3**).

Ces différences membranaires se traduisent par des comportements distincts en termes de transport et de libération (Rideau et al. 2018). Les liposomes tendent à favoriser des échanges plus rapides avec le milieu extérieur, tandis que les polymersomes offrent un contrôle plus marqué de la rétention des molécules encapsulées. La libération dépend ainsi principalement des propriétés de la membrane, notamment sa perméabilité, la masse molaire des copolymères ou encore leur cinétique de dégradation. L'optimisation de ces propriétés physico-chimiques est donc essentielle afin de garantir une libération efficace au site cible, tout en évitant une diffusion prématurée ou insuffisante du médicament.

Au-delà des propriétés membranaires intrinsèques, les systèmes vésiculaires, qu'ils soient lipidiques ou polymériques, peuvent être également conçus pour répondre à des

stimuli spécifiques, permettant un contrôle spatio-temporel de la libération des molécules encapsulées. Ces stratégies ont conduit au développement de systèmes de délivrance dits intelligents, capables de déclencher la libération de leur contenu en réponse à des stimuli variés tels que la température, le pH, les variations redox ou la lumière (Kauscher et al. 2019). Dans ce contexte, nous nous concentrons plus particulièrement sur le développement de polymersomes sensibles à un ou plusieurs stimuli.

1.5. DEVELOPPEMENT DE POLYMERSOMES INTELLIGENTS POUR LA DELIVRANCE CIBLEE ET CONTROLEE

1.5.1. Systèmes sensibles aux stimuli

Le développement de systèmes de délivrance sensibles aux stimuli constitue une stratégie importante pour contrôler la libération des composés encapsulés en réponse à des signaux spécifiques. Ces approches ont d'abord été largement développées pour les liposomes, dont certaines formulations stimuli-responsives ont atteint les phases cliniques, comme ThermoDox® et TarDox®, conçues pour la libération localisée de doxorubicine sous hyperthermie ou ultrasons focalisés dans le traitement du carcinome hépatocellulaire (tumeur primitive du foie) (Imunon 2024; Kansız and Elçin 2023; University of Oxford 2019).

Dans cette continuité, les polymersomes suscitent un intérêt croissant pour le développement de systèmes intelligents et contrôlables. La faible perméabilité des membranes des polymersomes, bien qu'avantageuses pour limiter la libération prématurée des molécules encapsulées, nécessite généralement l'ajout de mécanismes de déclenchement pour contrôler leur libération. Leur grande stabilité membranaire, leur polyvalence chimique et les nombreuses possibilités de fonctionnalisation offertes par les copolymères à blocs constituent ainsi des atouts majeurs pour le développement de systèmes sensibles à des stimuli.

Les stimuli peuvent être regroupés en deux grandes catégories : (i) les stimuli endogènes, liés à l'environnement biologique, tels que variations de pH, gradients rédox, présence d'enzyme spécifiques, et (ii) les stimuli exogènes, correspondant à des signaux physiques appliqués de manière externe, tels que la température, la lumière, les champs magnétiques ou encore les ultrasons (Hu et al. 2017). L'exposition à ces stimuli peut provoquer différentes réponses des polymersomes, comme des modifications de la solubilité des blocs amphiphiles, le clivage des liaisons sensibles ou encore une déstabilisation

membranaire (Hernández Becerra et al. 2022). Ces stratégies ont conduit au développement de nombreux polymersomes sensibles aux stimuli ; quelques exemples représentatifs sont présentés dans le **Tableau 2**.

Stimulus	Molécule encapsulée	Réponse du polymersome	Référence
Champ magnétique	Doxorubicine	Déformation et modification de la perméabilité membranaire	(Sanson et al. 2011)
Température	Doxorubicine	Désassemblage du polymersome et libération du cargo	(Qin et al. 2006)
Rédox	Calcéine	Dégradation des liaisons sensibles au rédox et désagrégation du copolymère à blocs	(Cerritelli, Velluto, and Hubbell 2007)
Rédox	Doxorubicine	Déstabilisation de la membrane	(K. M. Park et al. 2010)
pH	Doxorubicine	Hydrolyse des liaisons sensibles au pH	(X. Yang et al. 2010)
Température	FITC-Dextran	Modification de la perméabilité membranaire	(J. S. Lee et al. 2010)
Lumière	Biocytine	Activation photo-induite	(Robbins et al. 2009)
Ultrasons	ANTS (fluorochrome)	Augmentation de la perméabilité membranaire	(Pangu et al. 2010)

Tableau 2. Exemples de polymersomes sensibles à différents stimuli endogènes et exogènes. Les différents stimuli induisent des mécanismes de déstabilisation membranaire conduisant à des réponses telles que la perméabilisation, le gonflement ou le désassemblage des polymersomes, permettant la libération du cargo encapsulé. *Adapté de De Oliveira et al. (2012).*

Dans ce projet de thèse, nous nous intéressons plus particulièrement aux systèmes photoactivables, car ils permettent un contrôle précis, à la fois spatial et temporel, de la libération. De plus, les outils optiques sont particulièrement adaptés aux applications cerveau (voir partie **2.5.2**).

1.5.2. Polymersomes photoactivables

Rôle de la lumière comme stimulus exogène

La lumière est l'une des stratégies les plus prometteuses pour contrôler précisément, dans l'espace et le temps, la délivrance de médicaments grâce à l'optimisation de ses paramètres tels que la longueur d'onde, l'intensité, la durée et la localisation de l'illumination. Elle peut être générée par différentes sources, notamment des lasers ou des diodes électroluminescentes (LED), selon les propriétés spectrales et de l'intensité requise. Ce stimulus présente plusieurs avantages. D'une part, elle est généralement biocompatible

lorsqu'elle est utilisée dans la fenêtre thérapeutique optique des tissus biologiques (≈ 650-950 nm), et ses modalités d'utilisation, notamment en termes d'intensité et de durée d'exposition, sont déjà bien établies en clinique. D'autre part, elle permet d'induire des réponses photochimiques spécifiques et d'être focalisée avec une grande précision sur des zones localisées. Ainsi, ces caractéristiques confèrent à la lumière un avantage important par rapport aux stimuli endogènes. En effet, ces derniers dépendent de paramètres biologiques intrinsèques qui peuvent varier selon les individus, les tissus ou les états pathologiques, limitant alors le contrôle précis de la libération (Beauté, McClenaghan, and Lecommandoux 2019). La photochimie désigne l'ensemble des processus chimiques initiés ou contrôlés par l'absorption de photons, conduisant à des modifications structurales ou fonctionnelles des molécules impliquées. Ces mécanismes seront détaillés plus tard. Enfin, les progrès récents en optique et en ingénierie photonique ont permis de miniaturiser les sources lumineuses et de les rendre plus accessibles, facilitant ainsi le développement de systèmes de délivrance de médicaments activés par la lumière (Y. Yang et al. 2024).

Contraintes des longueurs d'onde en milieu biologique

Même si le spectre lumineux est large, seules certaines longueurs d'onde sont réellement exploitées en milieu biologique en raison des contraintes de phototoxicité et de pénétration tissulaire. Les ultraviolets (UV) (254-400 nm), caractérisés par une énergie photonique élevée, permettent d'induire des réactions photochimiques avec une grande efficacité, et sont ainsi utilisés dans divers systèmes photoactivables pour délivrer des médicaments. Cependant, leur application *in vivo* est fortement limitée par leur phototoxicité intrinsèque, notamment les dommages causés aux lipides, protéines et ADN (liaisons covalentes et non-covalentes au sein de ces molécules), ainsi que par leur faible pénétration tissulaire, nécessitant une action très locale (Barolet 2008; Beauté, McClenaghan, and Lecommandoux 2019; Hu et al. 2017) (**Figure 19**).

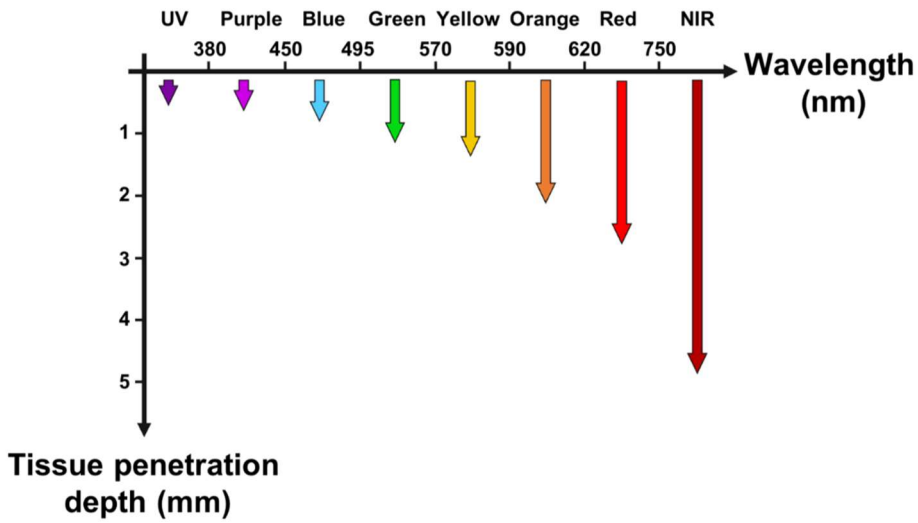


Figure 19. Représentation schématique de la pénétration de la lumière dans les tissus biologiques à différentes longueurs d'onde.
Reproduite de Beauté et al. (2019).

Lorsque la longueur d'onde augmente, la pénétration tissulaire s'améliore mais l'énergie photonique diminue. La lumière visible (400-600 nm) constitue ainsi un compromis intéressant (et parfois obligatoire) entre efficacité photochimique et biocompatibilité, ce qui explique son utilisation fréquente en nanomédecine. Cependant, sa pénétration tissulaire reste aussi limitée. Dans le domaine du proche infrarouge (NIR), la pénétration est nettement améliorée et la cytotoxicité est généralement plus faible. Toutefois, son énergie plus faible limite fortement son efficacité pour déclencher directement des réactions photochimiques (Hu et al. 2017).

Mécanismes de déstabilisation membranaire induits par la lumière

Mécanismes directs

La libération de composés encapsulés à l'intérieur des polymersomes peut être déclenchée par différents mécanismes photochimiques (**Figure 20**). En général, ces approches reposent sur l'activation de groupements photosensibles intégrés à la membrane des polymersomes, conduisant à une augmentation de sa perméabilité, voire à la rupture de la vésicule. A l'échelle moléculaire, ces mécanismes incluent notamment, le clivage photochimique de groupements sensibles à la lumière (ex. les motifs o-nitrobenzyle), l'isomérisation réversible de molécules photoconvertibles (*photoswitches*) (ex. l'azobenzène),

ou encore les réarrangements photoinduits plus complexes affectant les propriétés physico-chimiques des copolymères (**Figure 20**) (Fuchter 2020; Hu et al. 2017; Kauscher et al. 2019).

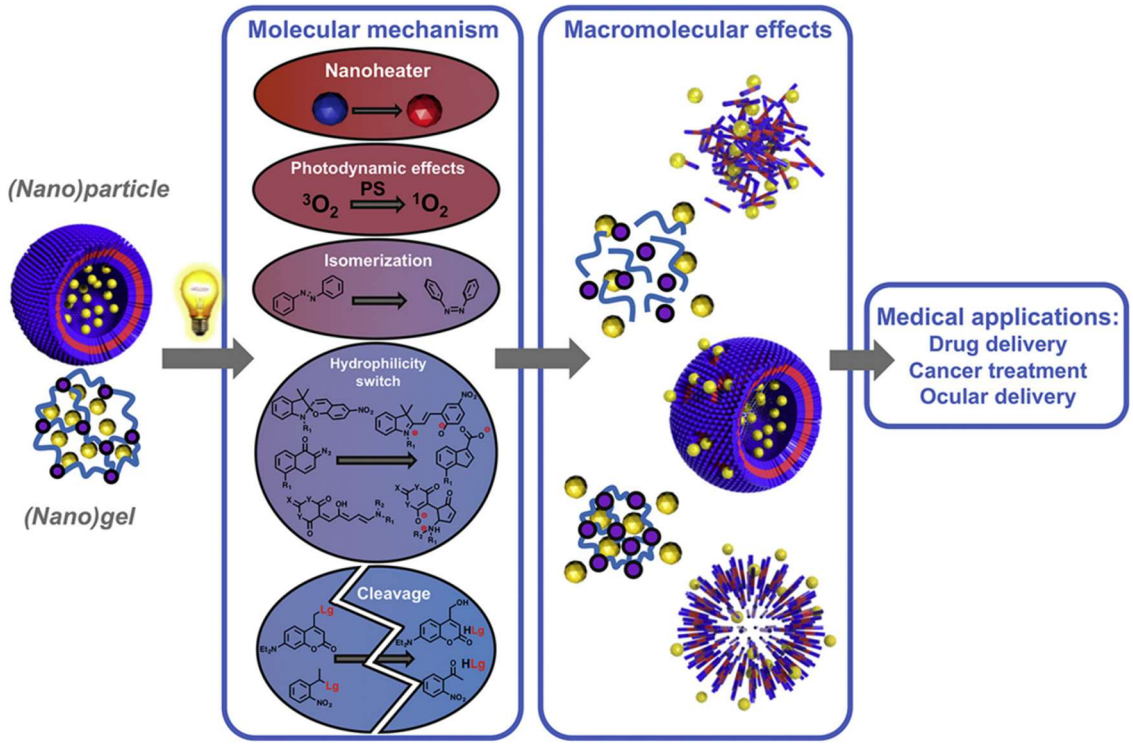


Figure 20. Représentation des mécanismes moléculaires induits par la lumière à l'origine de la libération contrôlée des médicaments à partir des systèmes de délivrance.
Reproduite de Beauté et al. (2019).

Par ailleurs la lumière peut également agir de manière indirecte sur la stabilité des polymersomes en modulant les conditions physico-chimiques du compartiment interne.

Mécanismes indirects : choc osmotique

Dans ce travail, une approche alternative repose sur la modulation de la pression osmotique interne, contrôlée par la lumière (Beauté, McClenaghan, and Lecommandoux 2019; Peyret, Ibarboure, Tron, et al. 2017a). L'équilibre osmotique est défini par la différence de concentration en solutés entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule, de même que pour les cellules vivantes. Lorsque ces concentrations sont égales, le système est en équilibre osmotique et la vésicule est dite isotonique. L'eau continue alors de diffuser à travers la membrane, mais les flux entrants et sortants étant équilibrés, aucun flux net n'est observé et le volume de la vésicule reste stable (**Figure 21A**). Lorsque la concentration interne est

supérieure à celle du milieu extérieur, la vésicule subit un choc hypotonique. Un flux d'eau entre alors dans la vésicule afin de réduire la pression, entrainant un gonflement progressif et une augmentation de la tension membranaire. Cette tension peut conduire à la rupture de la vésicule ou à la formation transitoires de pores, permettant la libération partielle du contenu encapsulé (**Figure 21B**). A l'inverse, lorsque la concentration externe est supérieure à celle de l'intérieur, la vésicule subit un choc hypertonique. L'eau diffuse alors hors de la vésicule afin de rétablir l'équilibre osmotique, induisant une diminution du volume interne, une réduction de taille, voire la rupture de la vésicule (**Figure 21C**).

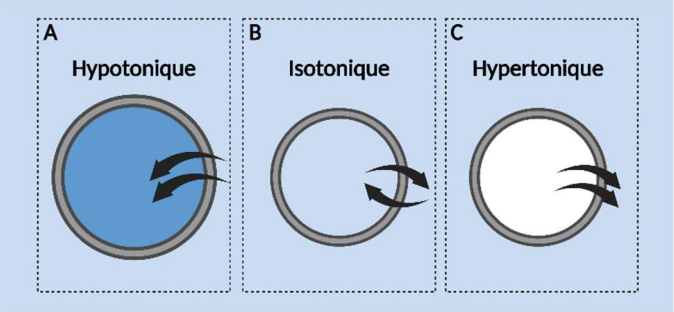


Figure 21. Représentation schématique des flux d'eau à travers la membrane des vésicules selon différentes conditions osmotiques.
Réalisée sur Biorender.com.

Les liposomes présentent généralement une bonne capacité d'adaptation à ces variations osmotiques, grâce à leur forte perméabilité à l'eau, conduisant principalement à des gonflements ou contractions réversibles, sans rupture. A l'inverse, les polymersomes, en raison de leur faible perméabilité à l'eau, ont une capacité d'adaptation limitée, et sont donc plus sensibles aux variations rapides de pression osmotique. Ainsi, il a été proposé qu'une augmentation rapide de l'osmolarité interne pourrait créer un déséquilibre suffisant pour provoquer leur rupture et la libération le contenu encapsulé (**Figure 22**) (Peyret, Ibarboure, Tron, et al. 2017a).

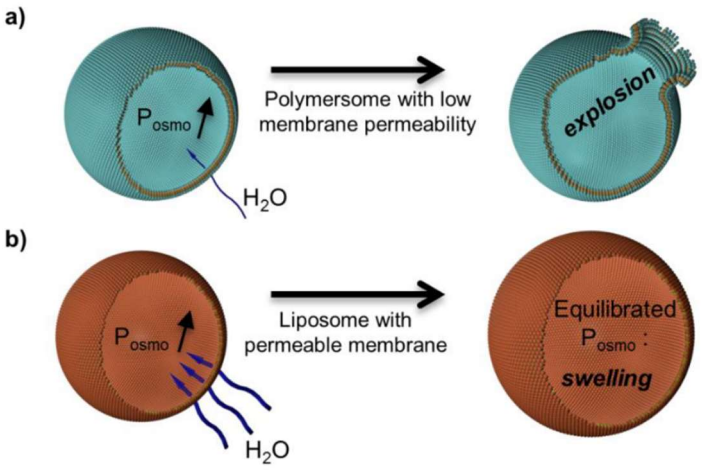


Figure 22. Comparaison de la réponse des polymersomes et des liposomes à une augmentation de la pression osmotique.
(A) La faible perméabilité membranaire des polymersomes limite les échanges d'eau avec le milieu extérieur. L'augmentation de la pression osmotique interne n'est donc pas compensée, ce qui entraîne une accumulation des contraintes mécaniques pouvant conduire à la rupture de la membrane. **(B)** Les membranes plus perméables des liposomes permettent une diffusion rapide de l'eau et la dissipation de pression osmotique. Cette compensation se traduit principalement par un gonflement de la vésicule, sans rupture irréversible de la membrane. *Reproduite de Peyret et al. (2017).*

Cette stratégie a été démontrée dans la littérature à l'aide de molécules photoclivables générant *in situ* plusieurs espèces osmotiques, entrainant une augmentation de l'osmolarité interne et la rupture des polymersomes. Plusieurs molécules ont été utilisées, notamment un dérivé de coumarine, de la calcéine ou encore le bleu de méthylène. Sous illumination, le dérivé de coumarine subit une photodégradation conduisant à la formation de plusieurs espèces hydrophiles (notamment une molécule de coumarine, une amine et du dioxyde de carbone) à partir d'un précurseur unique, augmentant rapidement l'osmolarité intravésiculaire (Beauté, McClenaghan, and Lecommandoux 2019; Klán et al. 2013). Pour la calcéine et le bleu de méthylène, les mécanismes semblent plus complexes. L'analyse RMN ^{1}H de la calcéine sous illumination suggère une dégradation photoinduite, impliquant probablement des mécanismes d'oxydation radicalaire via des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette dégradation conduirait à la formation de produits de clivage tels que l'acide formique, et des fragments issus des deux groupements méthylène voisins de la fonction carboxylate. Les polymersomes utilisés dans cette étude ont été formés à partir de copolymères amphiphiles de type poly(butadiène)-*b*-poly(éthylène glycol) (PBD-*b*-PEG). Sous illumination, les polymersomes ont été exposés à des longueurs d'onde d'excitation spécifiques (405 nm, 488 nm et 633 nm) en microscopie confocale, entrainant une rupture rapide de la membrane. Aucune déstabilisation n'a été observée en conditions contrôles

(absence de molécules photoclivables et illumination hors longueur d'onde d'excitation), confirmant que la rupture résulte spécifiquement de l'activation photochimique et du déséquilibre osmotique induit. En résumé, ces résultats démontrent le potentiel de la lumière pour induire, de manière indirecte, une déstabilisation contrôlée des polymersomes via des variations de pression osmotique.

Ainsi, les polymersomes photoactivables constituent des systèmes particulièrement prometteurs pour le développement de stratégies de délivrance thérapeutique contrôlée. Leur capacité à encapsuler différents types de composés, associée à la possibilité de déclencher leur libération avec un contrôle spatiale et temporel précis par la lumière, ouvre des perspectives importantes pour des applications nécessitant une délivrance localisée et précise. Ces propriétés présentent un intérêt particulier pour le traitement des pathologies du système nerveux central, où les approches thérapeutiques conventionnelles restent limitées par la complexité de l'environnement cérébral, la compartimentation du tissu nerveux et la présence de barrières biologiques hautement sélectives. Dans ce contexte, le développement de stratégies locales combinant neuromodulation, outils optiques et systèmes de délivrance contrôlables représente une voie particulièrement attractive. Le chapitre suivant s'intéressera ainsi aux spécificités biologiques et thérapeutiques du cerveau, ainsi qu'aux enjeux associés à la délivrance ciblée de médicaments dans le système nerveux central.

CHAPITRE 2

2. LE CERVEAU : UN ENVIRONNEMENT THERAPEUTIQUE COMPLEXE

Afin d'illustrer les enjeux liés à la délivrance thérapeutique dans le système nerveux central, ce chapitre s'appuie sur trois pathologies représentatives, qui seront décrites au fur et à mesure et qui présentent des besoins complémentaires en matière de ciblage et de contrôle spatio-temporel de l'action thérapeutique : la maladie de Parkinson, l'épilepsie et le glioblastome.

2.1. ORGANISATION COMPARTIMENTEE ET HETEROGENEITE FONCTIONNELLE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Tous les aspects de notre comportement humain, de la respiration à la gestion de nos pensées et nos émotions, sont contrôlés par le système nerveux (**Figure 23**).

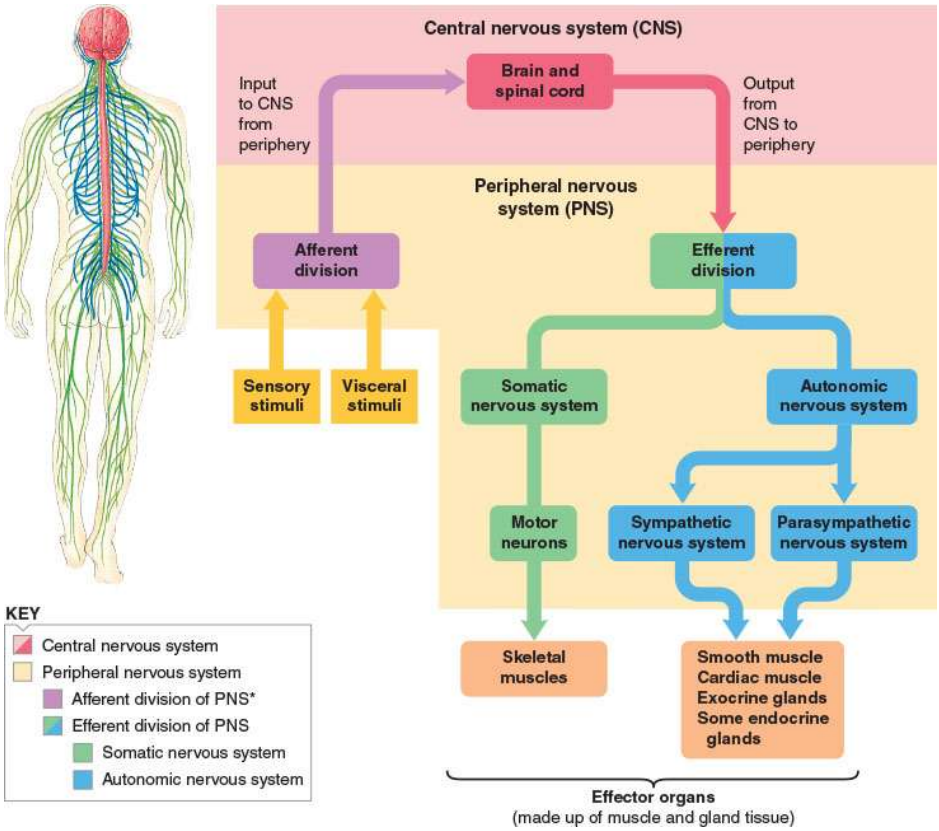


Figure 23. Organisation générale du système nerveux humain.

Schéma illustrant les principales subdivisions du système nerveux. Le système nerveux est organisé en un système nerveux central, comprenant l'encéphale et la moelle épinière, et un système nerveux périphérique, assurant la transmission des informations entre le système nerveux central et les organes périphériques. Le système nerveux périphérique comprend des voies afférentes, qui acheminent les informations sensorielles vers le système nerveux central, et des voies efférentes, responsables de la transmission des commandes vers les effecteurs. Ces derniers se divisent en système nerveux somatique et système nerveux autonome (sympathique et parasympathique). *Adaptée de Sherwood, Physiologie humaine : des cellules aux systèmes, 3e édition.*

Celui-ci se divise en système nerveux central et système nerveux périphérique. Le système nerveux central regroupe le cerveau et la moelle épinière, tandis que le système nerveux périphérique comprend l'ensemble des structures nerveuses situées en dehors du système nerveux central, à savoir le système nerveux autonome, le système moteur et le système sensoriel (**Figure 23**). Le cerveau constitue une partie importante du système nerveux central et représente probablement l'un des systèmes biologiques les plus complexes de l'organisme. Il assure la régulation des fonctions essentielles telles que les émotions, la mémoire, la cognition, la motricité, le rythme cardiaque, la respiration ou encore la digestion. Malgré les protections anatomiques assurées par la boîte crânienne, les méninges, le liquide céphalo-rachidien et la barrière hémato-encéphalique, il demeure particulièrement vulnérable aux perturbations mécaniques, chimiques ou biologiques (Bear, Paradiso, and Connors 2001).

Le cerveau se caractérise par une organisation hautement compartimentée, reposant sur des structures anatomiquement et fonctionnellement spécialisées mais fortement interconnectées (**Figure 24** et **Figure 25**) (Sporns 2013; Sporns and Betzel 2016).

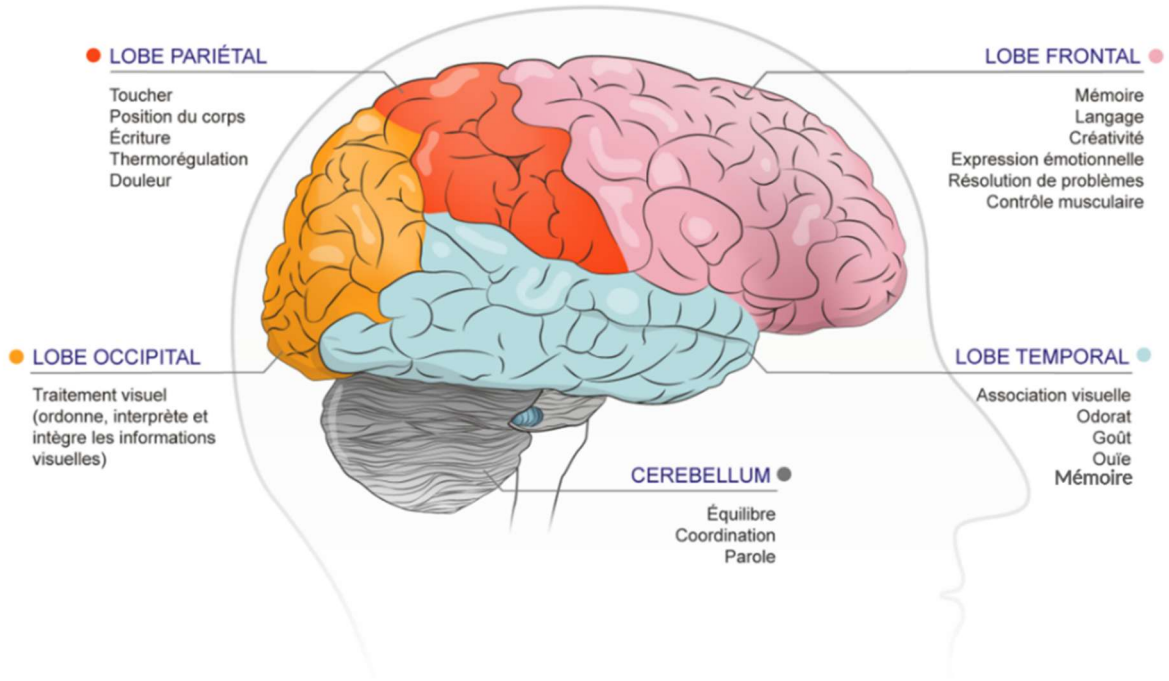


Figure 24. Principaux lobes cérébraux et fonctions associées.
Reproduite de l'Institut du Cerveau.

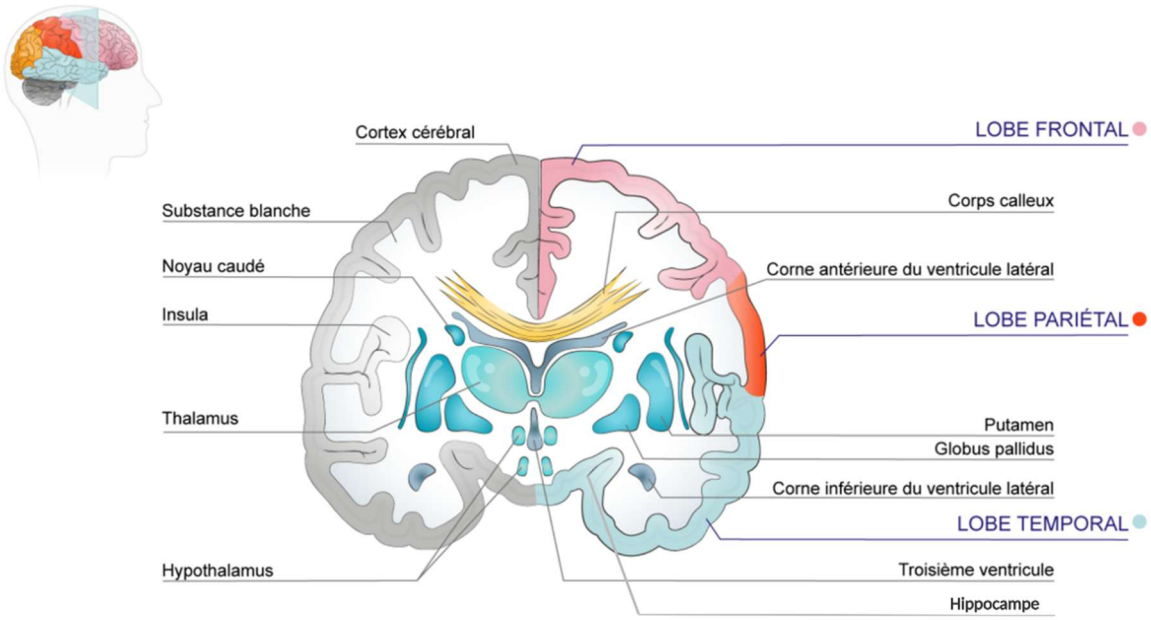


Figure 25. Principales structures anatomiques internes du cerveau.
Reproduite de l'Institut du Cerveau.

Le cortex cérébral, majoritairement constitué de substance grise riche en corps cellulaires neuronaux, est impliqué dans les fonctions cognitives telles que le langage, la mémoire, la perception ou la prise de décision. La substance blanche, composée principalement d'axones recouverts de myéline, une gaine lipidique favorisant la propagation rapide des signaux nerveux, assure quant à elle une communication entre les différentes régions cérébrales (Chorghay, Káradóttir, and Ruthazer 2018). D'autres structures profondes jouent également un rôle majeur dans le fonctionnement cérébral. Parmi elles, l'hippocampe intervient dans les processus de mémoire et d'apprentissage, le thalamus constitue un centre majeur de relais sensoriel, les ganglions de la base participent au contrôle moteur et à la planification des actions, tandis que le mésencéphale contient de nombreux noyaux neuromodulateurs qui innervent l'ensemble du cerveau (Bear, Paradiso, and Connors 2001). Cette organisation anatomique et fonctionnelle du cerveau conditionne fortement les stratégies thérapeutiques pouvant être mises en œuvre.

Ainsi, la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte dans la maladie de Parkinson perturbe les circuits des ganglions de la base (Jankovic 2025), alors que certaines formes d'épilepsie prennent naissance au sein de foyers localisés, fréquemment situés dans l'hippocampe ou le cortex temporal (J. S. Duncan et al. 2006). A l'inverse, le glioblastome peut infiltrer plusieurs régions cérébrales et perturber des fonctions

très diverses selon sa localisation (Nam and de Groot 2017). Ces exemples illustrent qu'une intervention thérapeutique efficace doit souvent cibler avec précision des structures cérébrales spécifiques tout en préservant les réseaux fonctionnels environnants.

Cette hétérogénéité s'observe également à l'échelle cellulaire, le système nerveux central reposant sur une grande diversité de types cellulaires (**Figure 26**).

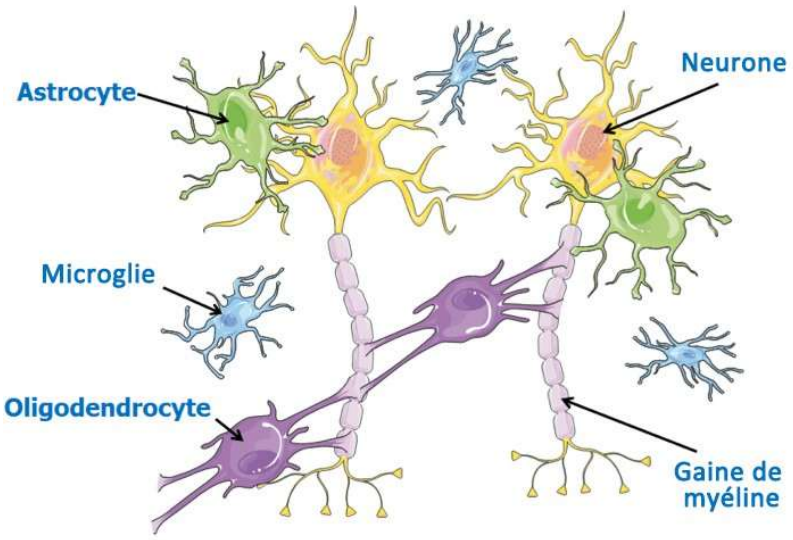


Figure 26. Principaux types cellulaires présents dans le système nerveux central.
Reproduite de EuroStemCell.

Il est constitué de neurones, responsables de la transmission des signaux électriques (Bear, Paradiso, and Connors 2001), ainsi que de cellules gliales assurant des fonctions de support et de régulation (Jäkel and Dimou 2017). Parmi ces dernières, les astrocytes participent au maintien de l'homéostasie cérébrale et au soutien métabolique des neurones (Verkhratsky and Nedergaard 2018), les oligodendrocytes assurent la myélinisation des axones (Stadelmann et al. 2019), alors que les cellules microgliales sont les macrophages résidents du système nerveux et organisent la surveillance immunitaire du tissu nerveux (Jäkel and Dimou 2017). Ces différentes populations cellulaires interagissent de manière dynamique au sein des réseau neuronaux et participent collectivement au fonctionnement cérébral. Au-delà de cette diversité intertype, des approches comme la transcriptomique à cellule unique et d'électrophysiologie ont récemment mis en évidence une importante hétérogénéité au sein même de populations cellulaires considérées comme homogènes (Yao et al. 2021). Cette très grande diversité concerne aussi bien les neurones, que les interneurones, les astrocytes ou les microglies (**Figure 27**) (Tan, Yuan, and Tian 2020).

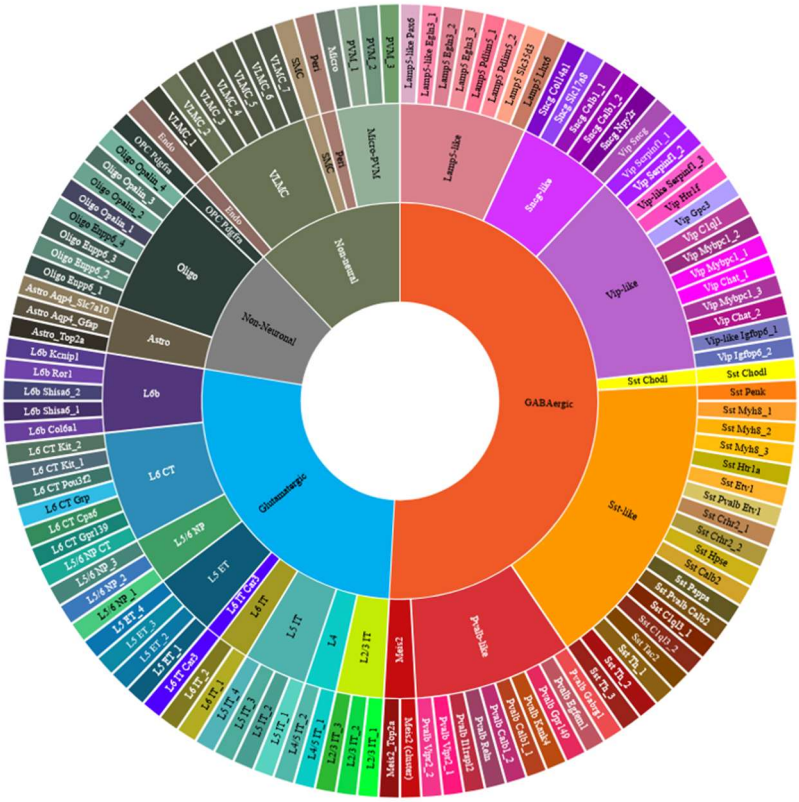


Figure 27. Hétérogénéité cellulaire du cerveau révélée par la transcriptomique à cellule unique.
Classification des populations cellulaires fondés sur les profils transcriptomiques, illustrant la diversité des types et sous-types cellulaires présents dans le système nerveux central. *Reproduite de l'Allen Institute for Brain Science.*

Cette complexité multi-échelle est également à considérer du point de vue temporel. Tout l'organisme est soumis à des rythmes biologiques, mais dans le cas du système nerveux les rythmes participent directement à sa fonction puisque la transmission neuronale qui est d'origine électrique peut s'appréhender en termes fréquentiel pour comprendre le codage de l'information neuronale. Certains processus sont de l'ordre de la milliseconde, comme les potentiels d'action, d'autres sont à l'échelle de la seconde avec les oscillations de réseau (Buzsáki, Anastassiou, and Koch 2012), tandis que d'autres processus cellulaires sont plus lents, à l'échelle des heures et des jours, avec la plasticité synaptique ou encore les régulations hormonales et inflammatoires. La temporalité de l'action thérapeutique peut donc s'avérer de première importance selon les pathologies. En effet, cette recherche de précision temporelle n'est parfois pas juste une optimisation, mais un réel enjeu thérapeutique afin d'éviter la désensibilisation du système comme cela arrive très fréquemment en biologie.

Ainsi, le système nerveux central se distingue par une organisation multi-échelle hautement spécialisée, allant de la structuration anatomique des circuits à l'hétérogénéité cellulaire fine. Cette complexité constitue un défi majeur pour le développement de stratégies thérapeutiques efficaces, en particulier lorsque celles-ci nécessitent un contrôle spatial et temporel précis de leur action.

2.2. PATHOLOGIES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET ENJEUX DU CIBLAGE THERAPEUTIQUE

Les maladies neurologiques représentent aujourd'hui l'une des causes majeures d'invalidité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une personne sur trois développera au cours de sa vie un trouble neurologique, ce qui en fait l'un des groupes de pathologies non transmissibles les plus fréquents (Global status report on neurology 2025; Organisation mondiale de la Santé 2024). Par ailleurs, les analyses récentes du *Global Burden of Disease* montrent une augmentation continue de leur incidence, notamment en lien avec le vieillissement de la population et l'allongement de l'espérance de vie (Zhou et al. 2025).

Les troubles neurologiques regroupent un ensemble très diversifié de pathologies affectant le système nerveux central, incluant les maladies neurodégénératives, les maladies neuropsychiatriques, les tumeurs cérébrales, les traumatismes, les accidents vasculaires ou encore les troubles du développement (Global status report on neurology 2025). Dans ce travail, trois pathologies cérébrales sont plus particulièrement considérées en raison de leurs caractéristiques complémentaires en termes de localisation, de mécanismes physiopathologiques et d'enjeux thérapeutiques : la maladie de Parkinson, l'épilepsie et le glioblastome.

La maladie de Parkinson touche plus de 10 millions de personnes dans le monde (M. Li et al. 2025) et résulte principalement de la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (**Figure 28**) (Obeso et al. 2017).

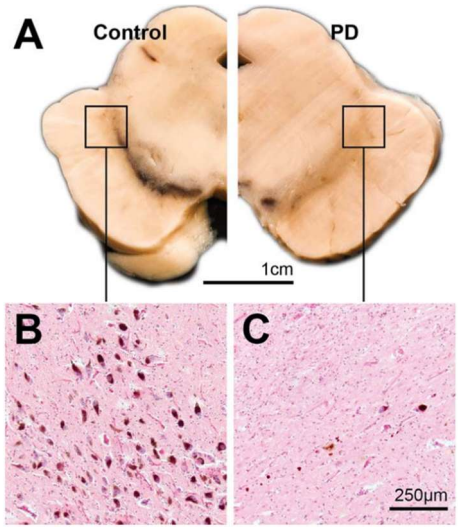


Figure 28. Perte des neurones dopaminergiques de la substance noire dans la maladie de Parkinson. La maladie de Parkinson se caractérise par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques pigmentés de la substance noire compacte. **(A)** Coupe transversale du mésencéphale chez un sujet contrôle (*Control)* et un patient atteint de la maladie de Parkinson (*PD*) montrant la diminution de la pigmentation de la substance noire. **(B-C)** Agrandissement de la région ventrolatérale de la substance noire illustrant la perte de neurones pigmentés chez le patient par rapport au sujet contrôle. *Reproduite de Obeso et al. (2017).*

Cette atteinte, bien que circonscrite à une population neuronale relativement restreinte, perturbe l'ensemble des circuits des ganglions de la base et entraîne des symptômes moteurs caractéristiques tels que les tremblements de repos, la bradykinésie (ralentissement des mouvements) et la rigidité musculaire, ainsi que de nombreux symptômes non-moteurs incluant les troubles digestifs, de l'humeur ou encore du sommeil. Cette pathologie illustre la nécessité de cibler avec précision une population neuronale spécifique localisée dans une structure cérébrale profonde (Jankovic 2025).

L'épilepsie, qui affecte plus de 50 millions de personnes dans le monde (World Health Organization 2024), est une maladie neurologique chronique caractérisée par une prédisposition durable à générer des crises résultant d'une activité neuronale excessive et synchronisée (J. S. Duncan et al. 2006). Dans de nombreuses formes focales, ces crises prennent naissance au sein de foyers épileptogènes localisés, fréquemment situés dans le lobe temporal médian, notamment au niveau de l'hippocampe, ou dans certaines régions corticales frontales (J. S. Duncan et al. 2006). Bien que localisées, ces altérations peuvent perturber le fonctionnement de réseaux neuronaux plus étendus et s'accompagner, à long terme, de modifications structurelles telles qu'une perte neuronale ou un amincissement cortical (Bröhl et al. 2024). Le contrôle thérapeutique de ces foyers pathologiques nécessite donc une grande précision spatiale afin de limiter l'activité épileptique tout en préservant les

réseaux cérébraux sains, mais également temporelle pour n'agir qu'en amont d'une crise à venir.

Enfin, le glioblastome constitue la tumeur cérébrale primitive la plus agressive chez l'adulte (J. Weller et al. 2024). Il correspond à un astrocytome de grade 4 caractérisé sur le plan histologique par une atypie nucléaire marquée, un pléomorphisme cellulaire important (capacité à adapter sa forme et sa physiologie), une activité mitotique élevée ainsi que la présence de nécrose et/ou de prolifération microvasculaire (Nam and de Groot 2017). Au-delà de cette agressivité biologique, il se distingue par une forte capacité d'infiltration du parenchyme cérébral et une importante hétérogénéité intra- et inter-tumorale (**Figure 29**), contribuant à sa résistance thérapeutique et à son pronostic clinique particulièrement défavorable (Pesce et al. 2025; Politis et al. 2025; M. Weller et al. 2024). Sa prise en charge nécessite d'atteindre efficacement des cellules tumorales disséminées au-delà de la masse tumorale visible tout en limitant les atteintes aux tissus cérébraux fonctionnels environnants (Bae, Maraka, and Daher 2024; J. Weller et al. 2024).

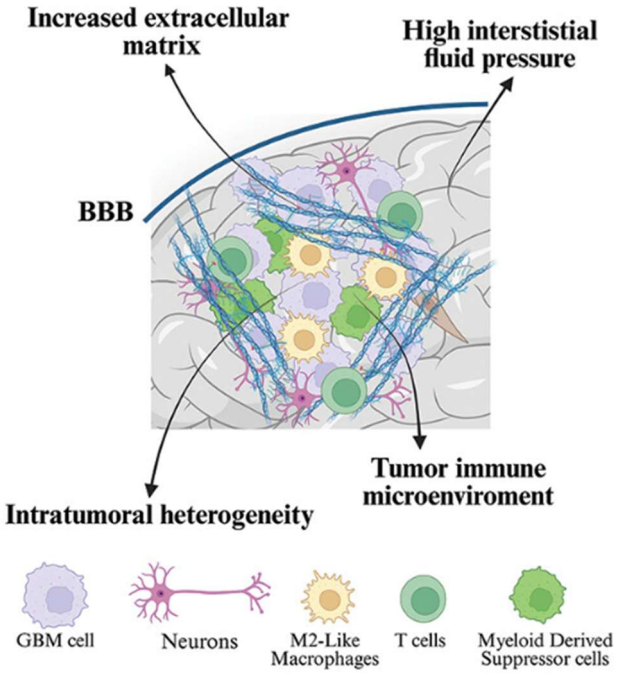


Figure 29. Principales caractéristiques du microenvironnement tumoral du glioblastome influençant la distribution des agents thérapeutiques.
Le glioblastome présente plusieurs caractéristiques susceptibles de limiter la pénétration et la distribution des traitements, notamment une forte densité cellulaire, une organisation complexe des espaces extracellulaires, une pression interstitielle élevée, des modifications de la matrice extracellulaire et un microenvironnement immunitaire particulier. Ces paramètres contribuent à la résistance thérapeutique dans cette pathologie. *Reproduite de Pesce et al. (2025).*

Malgré leurs mécanismes distincts, ces pathologies illustrent des défis complémentaires de ciblage thérapeutique au sein du système nerveux central : atteindre une population neuronale spécifique dans la maladie de Parkinson, moduler un foyer pathologique localisée dans l'épilepsie, ou encore traiter des cellules tumorales infiltrantes dispersées dans le parenchyme cérébral dans le glioblastome. Ces contraintes sont renforcées par la difficulté d'accès au cerveau et constituent un verrou majeur pour le développement de traitements efficaces et sélectifs.

2.3. LIMITES DE LA DELIVRANCE SYSTEMIQUE AU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

La prise en charge des maladies cérébrales repose largement sur des traitements pharmacologiques systémiques regroupant l'ensemble des agents thérapeutiques administrés principalement par voie orale, parfois intraveineuse , sous-cutanée ou intranasal (Partridge et al. 2022). Ces traitements constituent aujourd'hui l'approche thérapeutique la plus utilisée pour toutes les pathologies du système nerveux. Malgré leur importance clinique, leur efficacité demeure parfois limitée par les contraintes associées à la délivrance des agents thérapeutiques au sein du système nerveux central.

Après administration systémique, les médicaments sont distribués dans l'ensemble de l'organisme avant d'atteindre leur cible cérébrale. Cette biodistribution non spécifique entraîne une exposition importante des tissus périphériques et réduit la fraction de médicament disponible au niveau des structures d'intérêt (Bagal and Bungay 2014). En conséquence, des doses élevées sont fréquemment nécessaires pour obtenir un effet thérapeutique suffisant, augmentant le risque d'effets indésirables systémiques. De plus, ce mode d'administration ne permet pas de cibler une structure cérébrale en particulier et ne permet pas non plus une grande précision temporelle de l'action thérapeutique.

Cette problématique est particulièrement marquée dans le système nerveux central, dont l'accès est fortement restreint par plusieurs barrières biologiques spécialisées (Nance et al. 2022). Ces barrières limitent l'entrée de nombreuses molécules thérapeutiques et compliquent l'obtention de concentrations efficaces au niveau des tissus ciblés. Ainsi, malgré les progrès réalisés en pharmacologie, la délivrance précise et contrôlée des agents thérapeutiques au cerveau demeure un défi majeur.

Ce manque d'efficacité est en grande partie lié à la présence de barrières physiologiques régulant strictement les échanges entre le système nerveux central et la

circulation sanguine (Gosselet et al. 2021; Wu et al. 2023). Parmi celles-ci figurent notamment la barrière hémato-encéphalique (BHE), la barrière hémato-liquide cérébrospinal, la barrière hémato-rétinienne ainsi que la barrière hémato-médullaire (Gosselet et al. 2021). Ces interfaces assurent le maintien de l'homéostasie du système nerveux central en limitant l'entrée de molécules potentiellement neurotoxiques, d'agents pathogènes et de cellules immunitaires périphériques, tout en permettant l'apport contrôlé de nutriments essentiels. Parmi elles, la BHE détient une place centrale en assurant un contrôle particulièrement strict des échanges entre le sang et le cerveau. En raison de sa forte sélectivité, elle constitue le principal obstacle à la délivrance des agents thérapeutiques vers le système nerveux central (William M. Pardridge 2005). L'amélioration du franchissement ou du contournement de cette barrière représente ainsi un enjeu majeur pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques destinés aux pathologies neurologiques. Ses caractéristiques structurales et fonctionnelles sont présentées dans la section suivante.

2.4. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : UNE INTERFACE BIOLOGIQUE HAUTEMENT SELECTIVE ET RESTRICTIVE

2.4.1. Organisation structurale et fonctionnelle

La BHE a été initialement décrite par Paul Ehrlich et confirmée par Edwin Goldman au début du XXème siècle (Ribatti et al. 2006). Elle correspond à une interface hautement régulée localisée au niveau des cellules endothéliales du réseau microvasculaire cérébral. Elle constitue la principale interface d'échanges entre la circulation sanguine et le tissu cérébral, avec une surface totale estimée entre 12 et 18 m^2 chez l'adulte (Abbott et al. 2010), soulignant son importance à l'échelle du système nerveux central. Ce réseau microvasculaire, dont les capillaires cérébraux représentent le principal site fonctionnel, assure un apport strictement contrôlé en oxygène et en nutriments ainsi que l'élimination des métabolites neuronaux (Zlokovic 2008).

Sur le plan structural, la BHE est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales cérébrales associées aux péricytes, astrocytes et macrophages périvasculaires, formant l'unité neurovasculaire (**Figure 30**) (Markowicz-Piasecka et al. 2022; Terstappen et al. 2021).

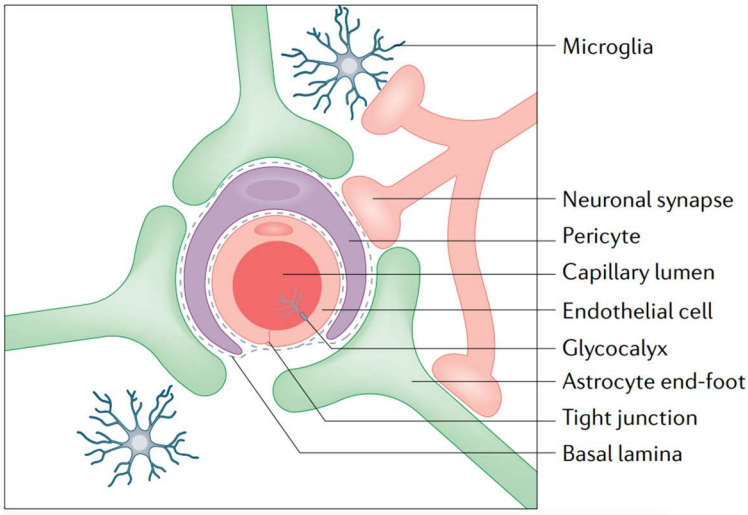


Figure 30. Structure de la barrière hémato-encéphalique et de l'unité neurovasculaire.
L'unité neurovasculaire est constituée de cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, entourées d'une lame basale, de péricytes, de prolongements astrocytaires, ainsi que de cellules neuronales et gliales contirbuant au maintien de l'homéostasie cérébrale. *Reproduite de Terstappen et al. (2021).*

Ces cellules présentent un phénotype de barrière hautement différencié, les distinguant des cellules endothéliales des réseaux vasculaires périphériques. Elles se caractérisent notamment par l'absence de fenestrations (pores transcellulaires, sauf à certaines 'frontières', comme avec l'épithélium olfactif, le nerf optique ou l'hypothalamus. Elles présentent aussi une très faible activité pinocytaire, correspondant à une capacité fortement réduite d'endocytose non spécifique et limitant l'internalisation vésiculaire de molécules circulantes. Enfin, ces cellules sont reliées entre elles par des structures jonctionnelles comprenant des jonctions serrées et des jonctions adhérentes, assurant une forte cohésion intercellulaire et contribuant fortement à l'imperméabilité de la BHE (Gosselet et al. 2021).

Sur le plan fonctionnel, la BHE joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie cérébrale en contrôlant finement les échanges d'ions, de nutriments et de molécules essentielles telles que le glucose et les acides aminés, tout en limitant l'entrée de composés potentiellement toxiques (Sweeney et al. 2019; Vendel, Rottschäfer, and de Lange 2019). Cette organisation repose sur une polarisation des cellules endothéliales, caractérisées par une membrane luminale et une membrane abluminale présentant une distribution asymétrique des systèmes de transport. Les transporteurs de la famille SLC (*Solute Carrier*) assurent l'entrée sélective de nutriments essentiels selon les gradients de concentration (Sweeney et al. 2019). A l'inverse, de nombreux composés exogènes ou xénobiotiques (notamment des agents thérapeutiques, des toxines et polluants environnementaux) sont

activement expulsés vers la circulation sanguine par des transporteurs d'efflux appartenant à la famille des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*), en particuliier la P-glycoprotéine (P-gp), limitant ainsi leur accumulation intracérébrale. Cette organisation traduit un équilibre entre fonctions de protection et de transport sélectif, fondé sur des mécanismes dont l'importance varie selon la nature et les propriétés physicochimiques des molécules considérées (Sweeney et al. 2019).

Différents mécanismes permettent le passage des molécules à travers la BHE en fonction de leurs propriétés physicochimiques (**Figure 31**) (Dong 2018; Wu et al. 2023). Ils comprennent la voie paracellulaire, fortement restreinte par les jonctions serrées, la diffusion transcellulaire des composés lipophiles, principale voie de passage des petites molécules, ainsi que des mécanismes de transport médiés par des transporteurs ou des récepteurs spécifiques. Des processus de transcytose peuvent également intervenir, bien qu'ils restent limités en conditions physiologiques et soient principalement exploités dans certaines stratégies thérapeutiques ciblées. A l'inverse, plusieurs mécanismes d'efflux participent activement à l'exclusion de nombreuses molécules du compartiment cérébral.

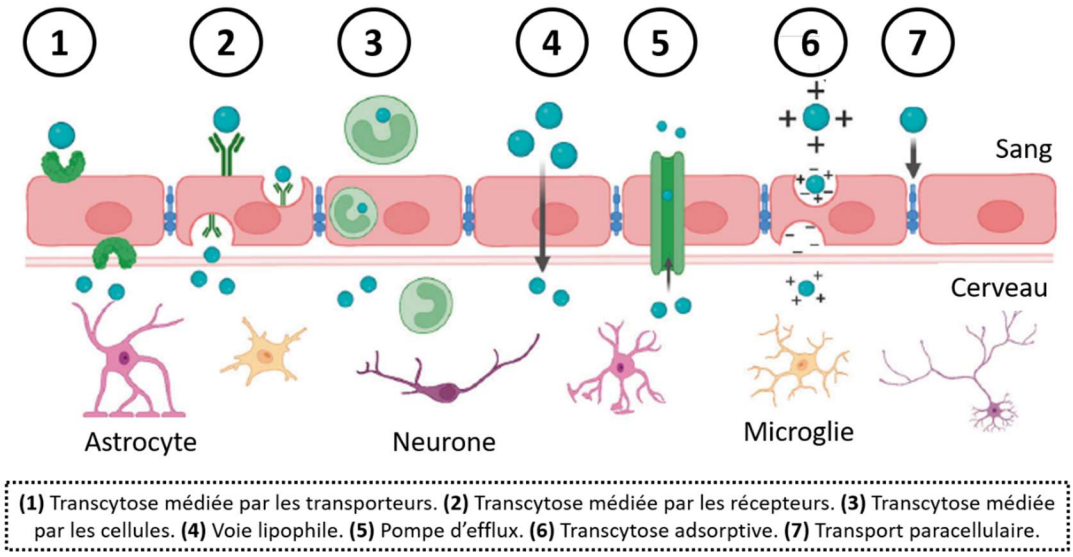


Figure 31. Principales voies de franchissement de la barrière hémato-encéphalique.
Schéma illustrant les différents mécanismes impliqués dans le passage des molécules à travers la barrière hémato-encéphalique. Ceux-ci comprennent la diffusion transcellulaire des molécules lipophiles, le transport paracellulaire, la transcytose médiée par des récepteurs, la transcytose médiée par des protéines de transport, entrée médiée par les protéines de transport de solutés (SLC) et trancytose adsorptive. *Adaptée de Wu et al. (2023).*

2.4.2. La BHE, un obstacle à la délivrance thérapeutique

Si la BHE est indispensable au maintien de l'homéostasie cérébrale, elle constitue également une contrainte majeure pour l'efficacité des traitements du système nerveux central (Gosselet et al. 2021).

Ainsi, une très faible proportion des molécules administrées par voie systémique atteint effectivement le tissu cérébral (**Figure 32**) (W. M. Pardridge 2003).

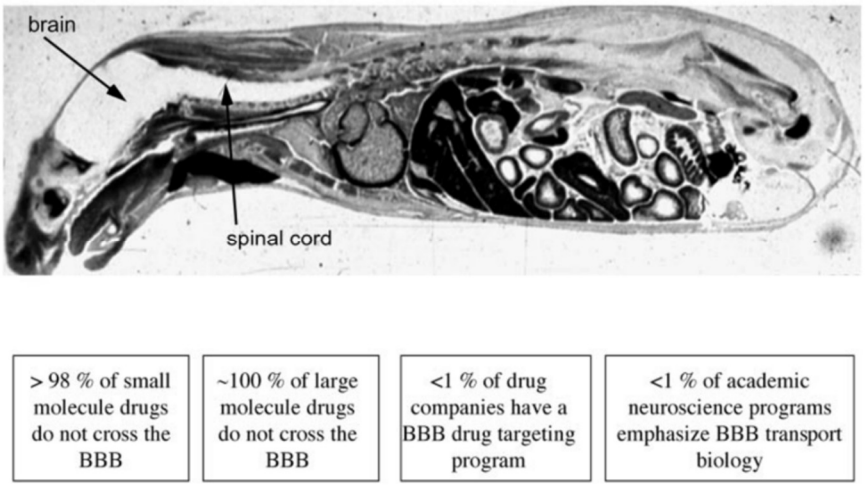


Figure 32. Exclusion cérébrale de l'histamine après administration systémique.
Autoradiographie corps entier d'une souris adulte réalisée 30 minutes après injection intraveineuse d'histamine radiomarquée. Alors que la majorité des organes présentent un marquage intense, le cerveau et la moelle épinière apparaissent pratiquement dépourvus de signal (zones blanches), illustrant la très faible pénétration de cette molécule dans le système nerveux central en raison de la barrière hémato-encéphalique. *Reproduite de Pardrige (2003).*

Le passage de la BHE dépend fortement des propriétés physicochimiques des composés, telles que leur masse moléculaire, leur lipophilie, leur polarité ou encore leur capacité à former des liaisons hydrogène. Ces paramètres sont en partie décrits par les règles de Lipinski, initialement développées pour prédire la biodisponibilité orale des médicaments mais souvent utilisées comme premier indicateur de propriétés favorables à la pénétration tissulaire (Lipinski et al. 2001). De manière générale, les petites molécules lipophiles (< 500 Da) franchissent plus facilement cette barrière que les molécules de grande taille ou fortement hydrophiles (W. M. Pardridge 2003).

Au-delà des propriétés physicochimiques favorisant le franchissement de la BHE, l'obtention d'une concentration thérapeutique efficace au niveau du tissu cible demeure un

défi majeur (Mikitsh and Chacko 2014). En effet, le passage de la barrière ne garantit pas nécessairement une efficacité thérapeutique optimale.

Dans la maladie de Parkinson, la dopamine ne traverse pas spontanément la BHE, ce qui nécessite l'administration de son précurseur, la lévodopa un dérivé d'acide aminé (van Vliet et al. 2023). La lévodopa franchit la barrière grâce au transporteur des acides aminés LAT1 (Ahmed 2025), mais sa distribution reste diffuse au sein du cerveau et ne se limite pas aux régions affectées par la maladie. De plus, la lévodopa est formulée avec un inhibiteur de la transformation de lévodopa en dopamine (le bensérazide) qui lui ne passe pas la BHE, permettant à la lévodopa de ne pas être métabolisée en dopamine tant qu'elle n'a pas intégré le cerveau.

Dans le cas du glioblastome, le témozolomide (TMZ) est l'agent chimiothérapeutique de référence, car c'est le seul qui présente une pénétration cérébrale suffisante pour permettre son utilisation clinique (Stupp et al. 2001). Toutefois, sa pénétration dans le système nerveux central demeure partielle et l'hétérogénéité de la perméabilité de la BHE au sein de la tumeur réduit l'exposition uniforme des cellules tumorales au traitement (Bastiancich et al. 2021). En particulier, les cellules infiltrantes localisées en périphérie tumorale, où la barrière demeure souvent fonctionnelle, restent difficilement accessibles, ce qui contribue aux fréquentes récidives observées après traitement (Dong 2018).

Par ailleurs, même lorsqu'un médicament atteint le cerveau, son efficacité peut être influencée par d'autres paramètres pharmacocinétiques. Par exemple, la carbamazépine, utilisée dans le traitement de certaines formes d'épilepsie, franchit efficacement la BHE mais sa forte liaison aux protéines plasmatiques (albumines) limite la fraction libre réellement disponible au niveau des foyers épileptogènes (Holland 2001). A l'inverse, l'eslicarbazépine présente une disponibilité plus importante sous forme libre (Holland 2001). Ces différences montrent que l'efficacité d'un traitement ne dépend pas uniquement de sa capacité à franchir la BHE, mais également de sa distribution et de sa disponibilité au niveau de la cible thérapeutique.

Enfin, même lorsqu'un composé parvient à traverser la BHE, son accumulation intracérébrale peut être réduite par l'action de transporteurs d'efflux appartenant à la famille ABC, notamment la P-glycoprotéine, qui réexportent de nombreux composés vers la circulation sanguine (Schinkel 1999). Ce phénomène a notamment été impliqué dans certaines formes pharmacorésistantes d'épilepsie, où une surexpression locale de ces

transporteurs pourrait contribuer à diminuer les concentrations cérébrales de plusieurs antiepileptiques (Löscher and Potschka 2005) .

Le **Tableau 3** synthétise les principales limites imposées par la BHE à différentes classes thérapeutiques ainsi que les besoins associés en nouvelles stratégies de délivrance.

Ainsi, bien qu'indispensable à la protection du cerveau, la BHE constitue un obstacle majeur à l'efficacité des traitements du système nerveux central. Comme l'illustrent les exemples de la maladie de Parkinson, l'épilepsie et du glioblastome, les difficultés ne se limitent pas au seul franchissement de la barrière mais concernent également la distribution, la rétention et l'accumulation des médicaments au niveau des régions cérébrales ciblées. Ces contraintes ont favorisé au développement de stratégies visant soit à améliorer le passage de la BHE, soit à la contourner par des approches de délivrance locale et ciblée au sein du système nerveux central (G. Wang et al. 2026). Ces différentes stratégies sont présentées dans la section suivante.

Classe thérapeutique	Pathologie associée	Molécule de référence	Voie d'administration	Passage de la BHE	Principales limites à la BHE	Pourquoi une nouvelle stratégie de ciblage est-elle nécessaire ?	Références
Précurseurs dopaminergiques	Maladies de Parkinson	**L-DOPA / Carbidopa**	Orale	**Partiel** *Transport actif via LAT1 (transporteur d'acides aminés)*	• Transport via LAT1 saturable • Compétition avec les acides aminés neutres circulants • Métabolisation périphérique réduisant la biodisponibilité cérébrale • Distribution cérébrale non spécifique après franchissement	Une stratégie permettant d'augmenter sélectivement l'exposition du striatum pourrait réduire la dépendance au transport via LAT1, limiter les fluctuations motrices et diminuer les doses systémiques nécessaires.	(Kalia and Lang 2015; Pardridge 2005)
Antiépileptiques	Epilepsie pharmaco-résistante	**Lévétiracétam / Carbamazépine**	*Orale*	**Oui** *Diffusion passive satisfaisante*	• Surexpression locale des transporteurs d'efflux ABC (P-g) • Diminution des concentrations thérapeutiques dans le foyer épileptique • Distribution cérébrale non spécifique • Exposition systémique accrue nécessaire	Une accumulation préférentielle du médicament dans le foyer épileptique, associée à une protection contre les mécanismes d'efflux, pourrait restaurer une exposition locale efficace tout en limitant l'augmentation des doses systémiques.	(Holland 2001; Kwan and Brodie 2000; Löscher and Potschka 2005; Waris et al. 2024)
Agents alkylants	Glioblastome	**Témozolomide / Carmustine**	*Orale*	**Partiel** *BHE hétérogène*	• Hétérogénéité spatiale de la BHE • Accès limité aux cellules infiltrantes en raison d'une BHE fonctionnelle intacte • Efflux tumoral limitant l'accumulation intracellulaire • Faible sélectivité tumorale	Des approches permettant d'atteindre les cellules tumorales infiltrantes protégées par une BHE fonctionnelle pourraient améliorer le contrôle tumoral tout en réduisant l'exposition des tissus sains.	(Friedman, Kerby, and Calvert 2000; Stupp et al. 2005; Van Tellingen et al. 2015; Weiss and Issell 1982)

Tableau 3. Impact de la BHE sur l'accès cérébral de différentes classes thérapeutiques et justification de nouvelles stratégies de ciblage. (Friedman, Kerby, and Calvert 2000; Holland 2001; Kalia and Lang 2015; Kwan and Brodie 2000; Löscher and Potschka 2005; William M. Pardridge 2005; Stupp et al. 2005; Van Tellingen et al. 2015; Waris et al. 2024; Weiss and Issell 1982).

2.5. STRATEGIES THERAPEUTIQUE LOCALES POUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

2.5.1. Du traitement systémique aux approches locales

Les limites des approches systémiques dans les pathologies du système nerveux central, notamment liées à la sélectivité de la BHE et à une distribution cérébrale difficilement contrôlable, ont conduit au développement de stratégies thérapeutiques visant une action directement au sein du tissu cérébral. Cette évolution traduit un changement de paradigme, passant d'une logique de diffusion systémique du médicament à une logique de contrôle local de l'interaction thérapeutique avec les circuits neuronaux pathologiques, afin d'améliorer la précision spatiale et temporelle de l'intervention.

Dans cette perspective, les stratégies locales peuvent être regroupées en deux grandes classes mécanistiques (**Figure 33**).

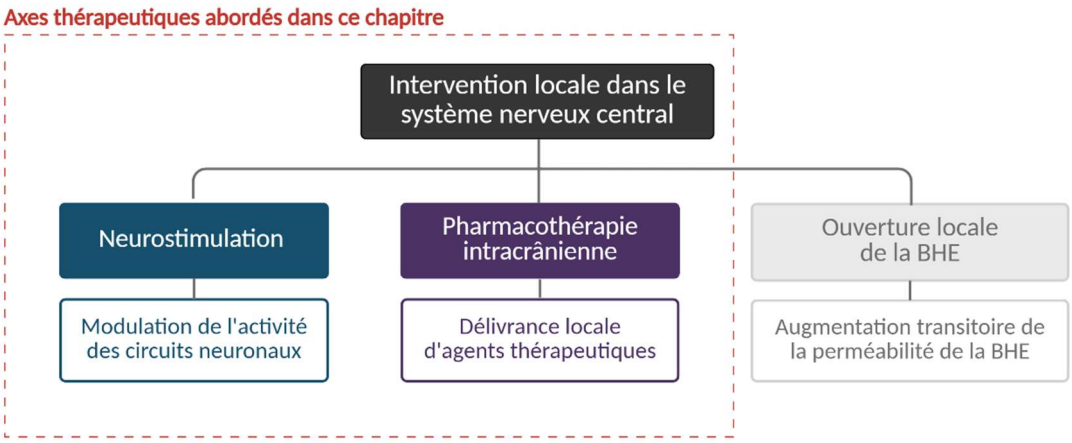


Figure 33. Principaux axes thérapeutiques explorés pour intervenir localement dans le système nerveux central.
Les approches développées dans ce chapitre se concentrant sur deux stratégies majeures : la neurostimulation, visant à moduler l'activité neuronale, et la pharmacothérapie intracrânienne, permettant une délivrance locale d'agents thérapeutiques. L'ouverture locale et transitoire de la barrière hémato-encéphalique constitue une approche émergente visant à améliorer l'accès des traitements au tissu cérébral, mais n'est pas développée dans ce travail. *Réalisée sur BioRender.com.*

La première correspond aux approches de neurostimulation directe des circuits neuronaux, qui agissent sur l'activité électrique ou fonctionnelle des réseaux cérébraux (Lacour, Courtine, and Guck 2016). La seconde repose sur la délivrance intracrânienne d'agents thérapeutiques, permettant une exposition locale du tissu cérébral indépendamment de la circulation systémique(Gernert and Feja 2020). Bien que différents dans leur nature, ces approches partagent un objectif commun : remplacer une logique de distribution systémique contrainte

par la BHE par une action locale, définie à l'échelle des circuits neuronaux ou des microenvironnements pathologiques. Récemment, des études ont également étudié la possibilité d'ouvrir transitoirement et localement la BHE, notamment à l'aide d'ultrasons, mais ces approches sont encore à l'état de développement (Singh and Reynolds 2024).

2.5.2. Neurostimulation des circuits neuronaux

Les approches de neurostimulation constituent aujourd'hui l'une des principales stratégies thérapeutiques locales développées pour les pathologies du système nerveux centrale (M. B. Lee et al. 2019). Contrairement aux traitements pharmacologiques, elles reposent sur une modulation directe de l'activité des circuits neuronaux par l'application contrôlée de stimuli physiques, principalement électriques. Cette approche est particulièrement adaptée aux pathologies dans lesquelles les symptômes résultent d'une altération fonctionnelle de réseaux neuronaux identifiables, comme la maladie de Parkinson ou certaines formes d'épilepsie pharmacorésistante.

Les dispositifs de neurostimulation appartiennent à la famille plus large des interface cerveau-machine, capables d'interagir avec le système nerveux par l'enregistrement et/ou la stimulation de l'activité neuronale (Lacour, Courtine, and Guck 2016; Lebedev and Nicolelis 2017). Initialement développées comme technologies de restauration fonctionnelle, notamment avec les implants cochléaires destinés à compenser certaines déficiences auditives (Mudry and Mills 2013; Nourski et al. 2013), ces approches ont progressivement évolué vers des outils de neurostimulation capables d'agir directement sur des circuits neuronaux pathologiques. Les progrès récents en bioélectronique, en science des matériaux, en micromécanique, ou encore en intelligence artificielle ont contribué à améliorer la miniaturisation, la précision et les capacités d'interaction de ces dispositifs avec le tissu nerveux (McGlynn et al. 2021).

Neurostimulation électrique : de la stimulation cérébrale profonde aux systèmes adaptifs

La stimulation cérébrale profonde (*Deep Brain Stimulation,* DBS) constitue aujourd'hui l'application clinique la plus aboutie de la neurostimulation implantable (Perlmutter and Mink 2006). Elle repose sur l'implantation d'électrodes au sein de structures cérébrales profondes reliées à un générateur d'impulsions implantable permettant la délivrance contrôlée de

signaux électriques (**Figure 34**). Dans les systèmes conventionnels, les paramètres de stimulation, notamment la fréquence, l'amplitude et la durée des impulsions, sont déterminés par le clinicien en fonction de la réponse thérapeutique du patient puis programmés dans le dispositif (Pycroft, Stein, and Aziz 2018). Ces paramètres demeurent ensuite généralement constants pendant plusieurs jours, semaines ou mois, jusqu'à un éventuel réajustement lors des consultations de suivi.

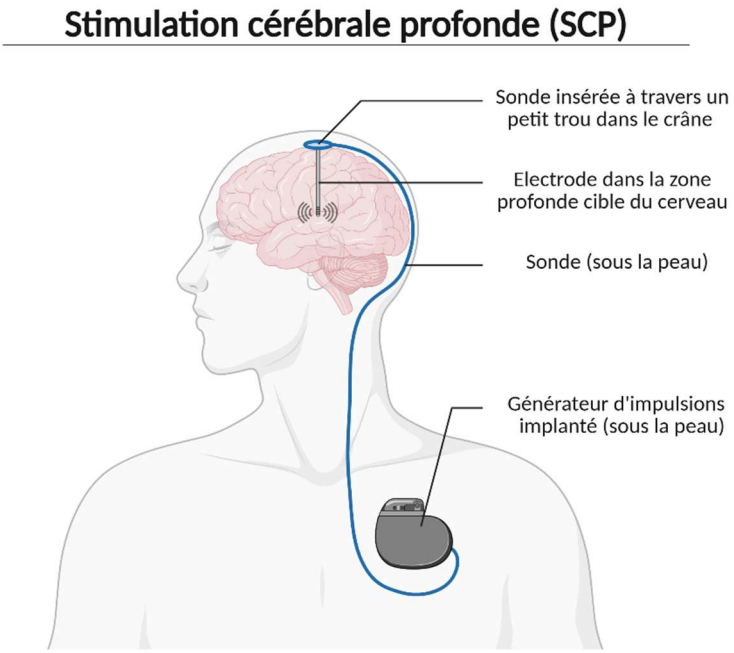


Figure 34. Principe de la stimulation cérébrale profonde.
La stimulation cérébrale profonde repose sur l'implantation d'une électrode dans une région cérébrale profonde d'intérêt pour moduler l'activité des circuits neuronaux ciblés. L'électrode est reliée à un générateur d'impulsions implanté sous la peau, permettant l'administration de stimulations électriques contrôlées. *Adaptée et réalisée avec Biorender.com.*

Dans la maladie de Parkinson, la stimulation cérébrale profonde vise principalement à restaurer l'équilibre fonctionnel des circuits des ganglions de la base perturbés par la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte. La stimulation de structures telles que le noyau sous-thalamique ou le globus pallidus interne permet d'améliorer significativement les symptômes moteurs, notamment les tremblements, la rigidité et la bradykinésie, et/ou de réduire la dose de lévodopa (Benabid 2003; Gupta, Vardalakis, and Wagner 2023).

Dans l'épilepsie pharmacorésistante, l'objectif est différent : il s'agit de limiter les activités épileptogènes au niveau des foyers épileptiques, notamment le thalamus antérieur,

l'hippocampe ou certaines régions corticales. Pour cela, les stimulations électriques sont utilisées pour réduire la fréquence et la sévérité des crises, afin d'éviter leur propagation aux tissus voisins (Dalkilic 2017; M. C. H. Li and Cook 2017; Zangiabadi et al. 2019). La stimulation cérébrale profonde est également explorée dans plusieurs troubles neuropsychiatriques sévères impliquant des dysfonctionnements des circuits limbiques et fronto-striataux, bien que les résultats demeurent plus variables selon les indications (Crowell et al. 2019; Drobisz and Damborská 2019; Mayberg et al. 2005).

Malgré son efficacité clinique, les mécanismes d'action précis de la stimulation cérébrale profonde restent encore partiellement compris et semblent dépendre des circuits ciblés ainsi que des paramètres de stimulation utilisés (Deniau, Degos, Bosch, et al., 2010). Son efficacité demeure également variable dans les réseaux non moteurs, notamment au sein des circuits limbiques impliqués dans la régulation des émotions et de la motivation. Enfin, les risques associés à la chirurgie intracrânienne ainsi que la nécessité d'un suivi spécialisé limitent son utilisation à une fraction des patients.

Une évolution majeure de ces dispositifs concerne le passage des systèmes conventionnels en boucle ouverte (*open-loop*) vers des approches adaptives en boucle fermé (*closed-loop*) (Zrenner and Ziemann 2024). Dans les systèmes en boucle ouverte, les paramètres de stimulation sont définis à partir de données cliniques et demeurent constants au cours du temps, indépendamment des fluctuations de l'activité cérébrale du patient. Cette approche ne tient pas compte du caractère dynamique et non stationnaire des réseaux neuronaux. A l'inverse, les systèmes en boucle fermée reposent sur l'enregistrement continu de signaux neurophysiologiques permettant d'ajuster en temps réel les paramètres de stimulation en fonction de l'état fonctionnel des circuits ciblés (**Figure 35**) (Blumenfeld and Brontë-Stewart 2015; Milekovic et al. 2023; Pycroft, Stein, and Aziz 2018).

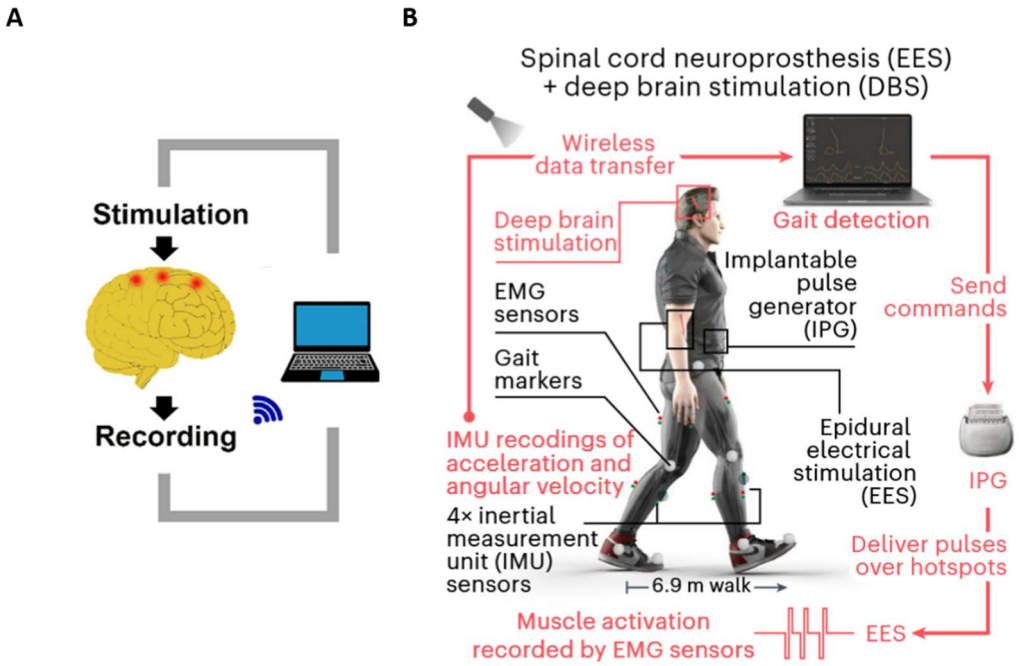


Figure 35. Principe des systèmes de stimulation cérébrale profonde en boucle fermée.
(A) Représentation schématique du fonctionnement général d'un système en boucle fermée, reposant sur l'enregistrement continu de signeux neurohysiologiques, leur analyse par une unité de contrôle et l'ajustement des paramètres de stimulation en fonction de l'état du système neuronal. (B) Exemple d'un dispositif de stimulation cérébrale profonde associé à une neuroprothèse combinant l'enregistrement de l'activité cérébrale et la stimulation du noyau sous-thalamique par une électrode de stimulation cérébrale profonde. Les signaux enregistrés permettent d'adapter en temps réel la stimulation délivrée au patient. *Reproduite de Hee Lee et al. (2022) et de Milekovic et al. (2023).*

Dans la maladie de Parkinson, cette approche permet par exemple d'adapter la stimulation aux variations des oscillations pathologiques observées dans les circuits moteurs (Little et al. 2013; Milekovic et al. 2023). Dans l'épilepsie, elle peut permettre la détection précoce d'activités épileptiformes annonciatrices d'une crise et déclencher automatiquement une stimulation corrective (Bergey et al. 2015; Roa et al. 2022; Sisterson et al. 2019; Skarpaas, Jarosiewicz, and Morrell 2019). En ajustant dynamiquement la stimulation à l'état fonctionnel des circuits ciblés, ces stratégies permettent de limiter les phénomènes de sursimulation, de réduire la consommation énergétique des dispositifs implantés et d'améliorer potentiellement leur efficacité thérapeutique. Ces systèmes de neurostimulation adaptative constituent désormais une réalité clinique dans certaines indications neurologiques, illustrant la transition progressive vers des thérapies guidées par l'activité cérébrale elle-même (B. Zhu, Shin, and Shoaran 2021). Si ces approches reposent sur une modulation électrique relativement peu sélective des populations cellulaires recrutées, de nouvelles stratégies de neurostimulation ont été développées afin d'atteindre un niveau de résolution spatiale et

cellulaire supérieur. Parmi elle, l'optogénétique s'est imposée comme un outil majeur pour l'étude fonctionnelle des circuits neuronaux en recherche préclinique (Fenno, Yizhar, and Deisseroth 2011).

Vers des approches de neurostimulation à haute résolution : l'optogénétique

Si la stimulation électrique constitue aujourd'hui la référence clinique en matière de neurostimulation, sa principale limite réside dans sa faible spécificité cellulaire. Les champs électriques générés par les électrodes stimulent simultanément différentes populations neuronales et fibres de passage, rendant difficile l'identification précise des circuits responsables des effets observés et contribuant à la variabilité des résultats observés. Cette limite a largement motivé le développement de l'optogénétique, devenue un outil majeur pour l'étude fonctionnelle du système nerveux central (Delbeke et al. 2017).

L'optogénétique repose sur l'expression ciblée de protéines photosensibles appelées opsines, capables de moduler l'activité électrique des cellules en réponse à une stimulation lumineuse (**Figure 36**) (Yawo 2021).

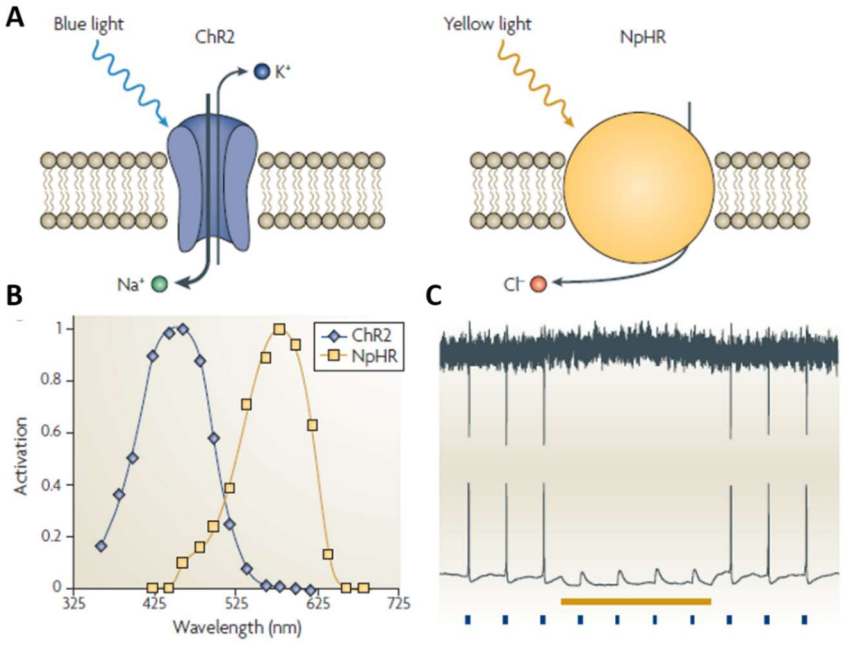


Figure 36. Contrôle optique de l'activité neuronale à l'aide d'opsines photosensibles.
(A) Les opsines photosensibles channelrhodopsine-2 (ChR2) et halorhodopsine (NpHR) permettent respectivement l'activation et l'inhibition de l'activité neuronale sous illumination lumineuse. **(B)** Leurs spectres d'activation présentent des maxima distincts autour de 470 nm et 580 nm, autorisant un contrôle indépendant de chaque opsine. (C) Les enregistrements électrophysiologiques montrent l'induction de potentiels d'action sous activation de ChR2 et leur suppression lors de l'activation de NpHR. *Adaptée de Fenno et al. (2011).*

Contrairement à la stimulation électrique, dont la sélectivité dépend essentiellement de la position de l'électrode, cette approche permet de contrôler spécifiquement des populations cellulaires définies génétiquement (**Figure 37**). Selon les opsines utilisées, la lumière peut induire soit une activation par dépolarisation membranaire, soit une inhibition de l'activité électrique par hyperpolarisation (Fenno, Yizhar, and Deisseroth 2011).

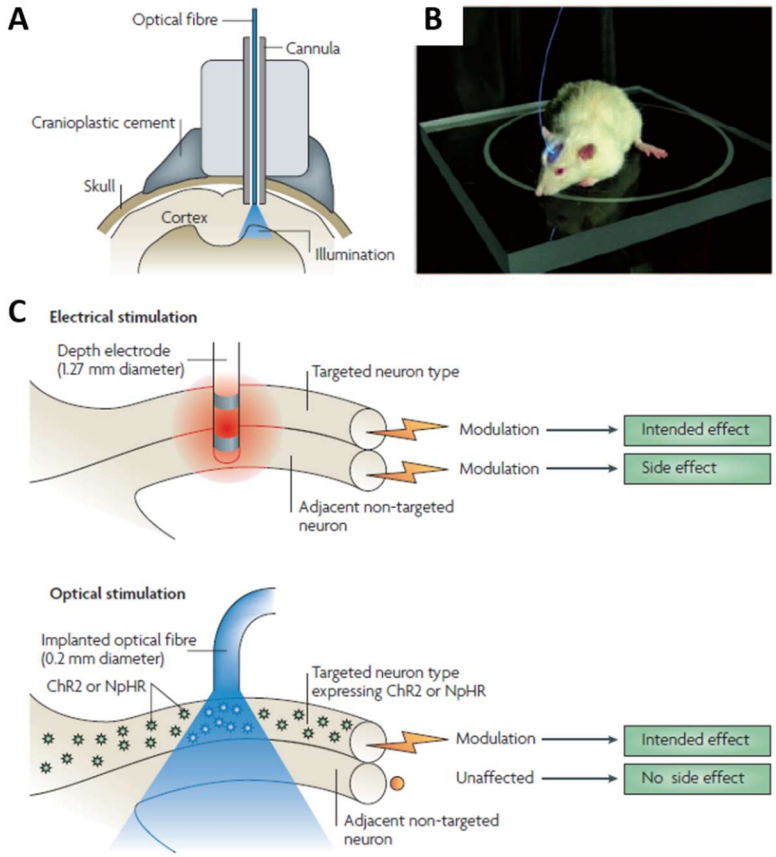


Figure 37. Principe de l'optogénétique *in vivo*.
(A) Implantation d'une fibre optique au sein d'une région cérébrale d'intérêt à l'aide d'une canule. **(B)** La fibre optique est reliée à une source lumineuse afin d'acheminer la lumière dans le tissu cérébral et d'activer les opsines exprimées par les cellules d'intérêt. **(C)** L'expression ciblée de la channelrhodopsine-2 (ChR2) ou de l'halorhodopsine (NpHR) dans des populations neuronales définies permet une stimulation sélective de leur activité. Cette spécificité cellulaire consitue un avantage majeur par rapport à la stimulation électrique, qui active simultanément plusieurs populations neuronales et fibres de passage. *Adaptée de Fenno et al. (2011).*

Cette résolution cellulaire a profondément transformé la compréhension des circuits impliqués dans de nombreuses pathologies neurologiques (Towne and Thompson 2016). Dans la maladie de Parkinson, l'optogénétique a notamment permis de dissocier la contribution de différentes populations neuronales responsables et voies de projection impliquées dans les effets thérapeutiques de la stimulation cérébrale profonde. Des travaux réalisés chez la souris

ont notamment montré que l'activation sélective de la voie cortico-subthalamique pouvait reproduire une partie des bénéfices moteurs observés lors de la stimulation du noyau subthalamique, suggérant l'implication de circuits spécifiques dans les mécanismes d'action de la stimulation cérébrale profonde (Gradinaru et al. 2009). Ces résultats ont contribué à faire évoluer la compréhension des effets de la stimulation cérébrale profonde, même si la contribution respective des différentes populations neuronales et des projections axones recrutées par stimulation demeure encore discutée (Yu et al. 2020). Dans l'épilepsie, l'optogénétique a permis de démontrer qu'une modulation sélective de populations neuronales définies pouvait influencer l'initiation et la propagation des crises. En particulier, l'activation d'interneurones inhibiteurs GABAergiques, notamment ceux exprimant la parvalbumine, ainsi que l'inhibition de neurones excitateurs, ont montré des effets anticonvulsivants dans plusieurs modèles expérimentaux (Sessolo et al. 2015). Toutefois, l'impact de ces populations sur la dynamique des crises apparaît fortement dépendant du contexte expérimental, du type de réseau étudié et de l'état physiologique au moment de la stimulation (Krook-Magnuson et al. 2013). Ces travaux illustrent néanmoins la capacité spécifique de l'optogénétique à atteindre un niveau de contrôle des circuits cérébraux inaccessibles aux approches électriques conventionnelles.

Les développements récents en microélectronique en bio-ingénierie ont conduit à l'émergence de dispositifs optogénétiques miniaturisés intégrant micro-LED (Jeong et al. 2015; T. Kim et al. 2013; S. I. Park, Brenner, et al. 2015; S. I. Park, Shin, et al. 2015; Shin et al. 2017) (**Figure 38**), fibres optiques et systèmes d'enregistrement électrophysiologique à haute densité (Qazi et al. 2018). Ces plateformes permettent désormais des expériences de neurostimulation en boucle fermée chez l'animal libre de ses mouvements (Lorca-Cámara, Blot, and Accanto 2024; Silva and Jacinto 2025).

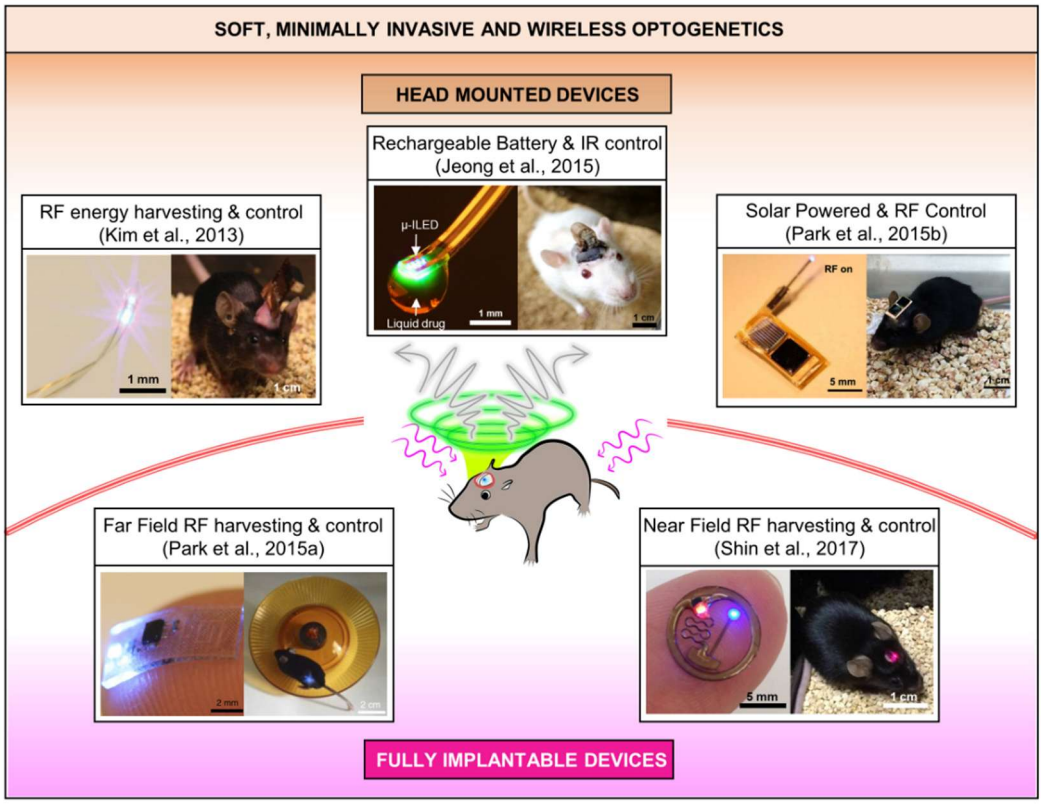


Figure 38. Exemples de dispositifs optogénétiques miniaturisés sans fil intégrant des micro-LED.
Les progrès récents en microélectronique ont permis le développement de systèmes optogénétiques miniaturisés, souples et sans fil, pouvant être implantés ou portés par l'animal. Ces dispositifs permettent la réalisation d'expériences de neurostimulation chez des animaux libres de leur mouvement. *Reproduite de Qazi et al. (2018).*

L'optogénétique a également franchi les premières étapes de la translation clinique. Un essai clinique de phase I a notamment démontré une restauration partielle de la perception visuelle chez des patients atteints de dégénérescence rétiniennes héréditaires grâce à l'expression de l'opsine ChrimsonR dans les cellules rétiniennes survivantes, combinée à un système de stimulation lumineuse externe (Kralik et al. 2022; Sahel et al. 2021).

Toutefois, l'application de ces approches aux structures cérébrales profondes demeure limitée par la nécessité d'une modification génétique préalable des cellules ciblées. La délivrance efficace et durable des vecteurs viraux, le contrôle de la spécificité d'expression ainsi que la maîtrise des risques immunologiques constituent encore des obstacles majeurs à leur développement clinique dans les pathologies du système nerveux central (D. Zhu et al. 2022).

Ainsi, les stratégies de neurostimulation illustrent la possibilité d'agir directement sur les circuits neuronaux responsables des symptômes neurologiques, sans recourir à une distribution systémique de molécules thérapeutiques. Elles répondent particulièrement aux

situations dans lesquelles une modulation fonctionnelle ciblée des réseaux neuronaux est recherchée, comme la maladie de Parkinson ou l'épilepsie (Kralik et al. 2022). Lorsque l'effet thérapeutique repose au contraire sur l'action locale d'un médicament, d'une biomolécule ou d'un vecteur biologique, d'autres approches de délivrance intracrânienne doivent être envisagées. Ces stratégies sont présentées dans la section suivante.

2.5.3. Pharmacothérapie intracrânienne et délivrance locale

Comme discuté dans la section **2.4.2**, de nombreuses classes thérapeutiques atteignent difficilement leurs cibles au sein du système nerveux central après administration systémique. Si le franchissement de la BHE constitue une première limite, l'obtention d'une concentration thérapeutique suffisante au niveau des régions pathologiques demeure également un défi majeur (Pitz et al. 2011; Rolfe et al. 2024). La pharmacothérapie intracrânienne a été développée pour contourner ces obstacles en permettant l'administration directe d'agents thérapeutiques au sein du tissu cérébral (Gernert and Feja 2020a). Cette approche vise non seulement à s'affranchir des contraintes liées à la BHE, mais également à améliorer la précision spatiale de l'action thérapeutique en délivrant les traitements au plus près des sites pathologiques.

Dans cette perspective, les agents thérapeutiques peuvent être administrés sous forme libre ou encapsulée dans différents systèmes de délivrance destinés à améliorer leur stabilité, leur distribution et leur cinétique de libération. Cette stratégie présente un intérêt particulier pour les trois pathologies considérées dans ce travail. Dans la maladie de Parkinson, elle vise à cibler plus efficacement les circuits dopaminergiques dégénérés. Dans l'épilepsie focale, elle permet d'agir localement au niveau des foyers épileptogènes responsables de l'initiation des crises. Dans le glioblastome, elle cherche à atteindre des cellules tumorales infiltrantes souvent insuffisamment exposées aux traitements systémiques.

Délivrance intracrânienne de médicaments

Plusieurs stratégies illustrent déjà le potentiel de la pharmacothérapie intracrânienne. Dans l'épilepsie pharmacorésistante, des systèmes implantables associant cathéters et pompes permettent l'administration chronique d'agents antiépileptiques directement dans les ventricules cérébraux (**Figure 39** et **Figure 40**) (Gernert and Feja 2020b).

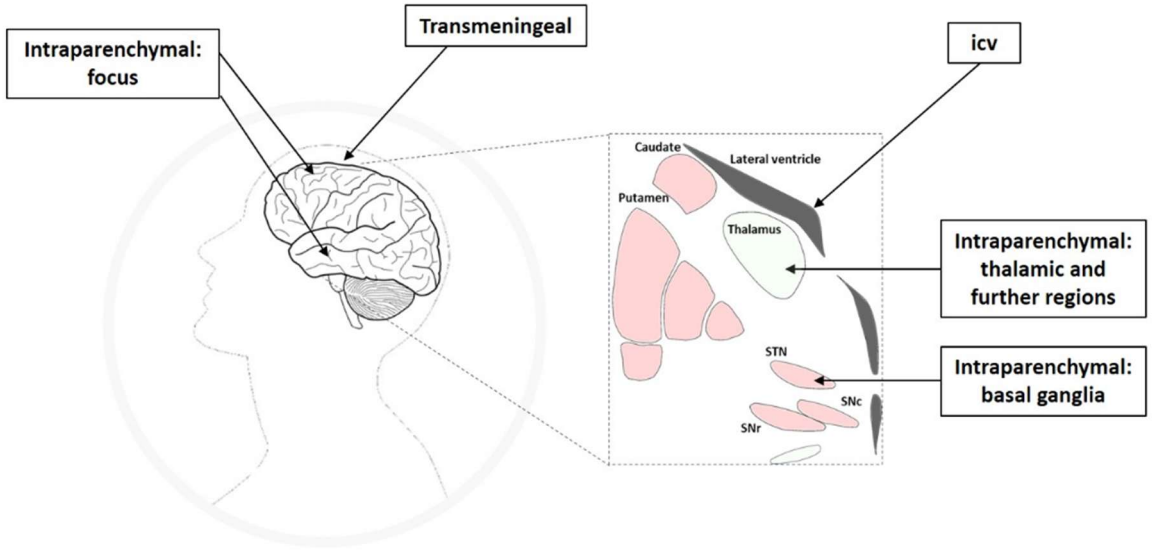


Figure 39. Principales voies de délivrance intracrânienne de médicaments dans l'épilepsie pharmacorésistante.
Les agents thérapeutiques peuvent être administrés directement au niveau des foyer épileptique par voie intraparenchymateuse, ou indirectement par voie intraventriculaire ou transméningée. Certaines approches ciblent également des structures cérébrales impliquées dans les réseaux épileptiques, telles que le thalamus ou les noyaux gris centraux. *Reproduite de Gernert et al. (2020).*

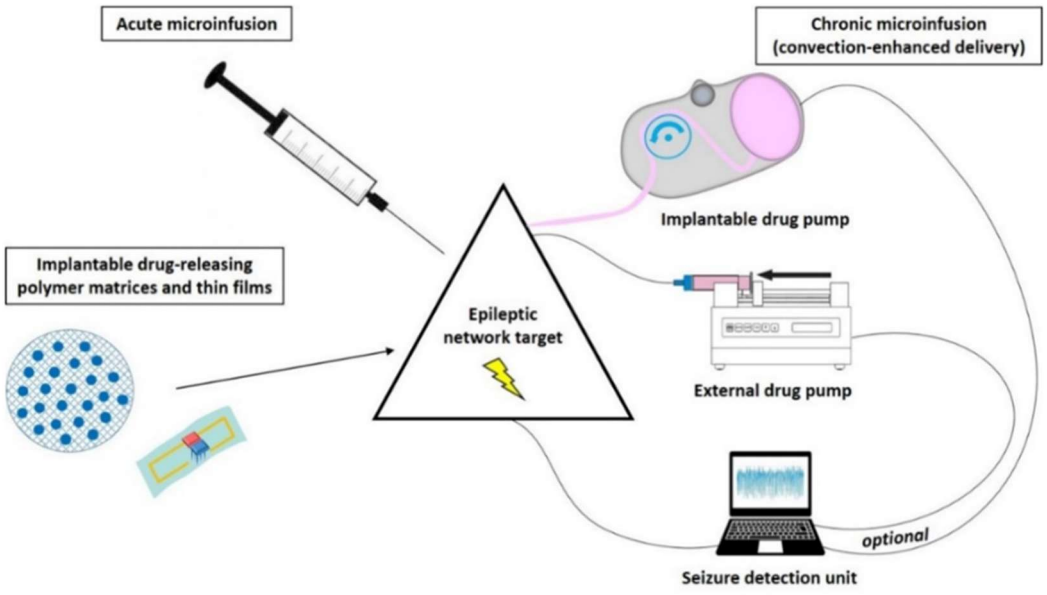


Figure 40. Principales technologies de délivrance intracrânienne de médicaments utilisées pour la stimulation des réseaux épileptiques.
Les agents thérapeutiques peuvent être administrés localement à l'aide de systèmes à libération contrôlée (polymères, particules) ou par l'intermédiaire de cathéters reliés à des réservoirs ou à des pompes de micro-infusion implantables. Selon le dispositif utilisé, la distribution du médicament repose sur la diffusion passive ou sur la convection forcée. Certaines plateformes permettent une administration intermittente programmable et peuvent être associées à des systèmes de détection de crises ouvrant la voie à une délivrance thérapeutique adaptative en boucle fermée. *Reproduite de Gernert et al. (2020).*

Une étude clinique pilote a notamment démontré la faisabilité et la tolérance d'une administration intraventriculaire prolongée d'acide valproïque chez des patients atteints d'épilepsie réfractaire, avec une réduction de la fréquence de crises et une exposition systémique limitée (Cook et al. 2020). Sur le plan mécanistique, cet effet est attribué à l'augmentation de la transmission inhibitrice GABAergique et à la diminution globale de l'excitabilité neuronale. Ces résultats ont conduit au lancement d'un essai clinique de phase II visant à confirmer l'efficacité de cette approche chez des patients présentant des crises focales pharmacorésistantes (Cerebral Therapeutics Announces Enrollment of First Patient in a Multicenter Randomized Controlled Phase 2b Trial in Epilepsy 2020). Des approches plus localisées ont également été explorées, notamment l'administration transitoire de lidocaïne au niveau des régions corticales épileptogènes. La lidocaïne agit en bloquant les canaux sodiques voltage-dépendants, ce qui limite la génération et la propagation des décharges neuronales pathologiques. Ce type d'application a été utilisé comme outil de modulation pharmacologique locale lors d'explorations préchirurgicales, permettant de tester la contribution fonctionnelle de régions corticales spécifiques à la genèse de crises (Smith et al. 1993).

Dans le glioblastome, l'exemple clinique le plus emblématique est celui des implants Gliadel®, constitués de matrices polymériques biodégradables chargées en carmustine et implantées directement dans la cavité de résection tumorale (**Figure 41**) (Pena et al. 2021). Ces dispositifs permettent une libération locale et prolongée de cet anticancéreux puissant au contact du tissu tumoral résiduel, en limitant l'exposition systémique. Dans une vaste cohorte de surveillance incluant 506 patients (Iuchi et al. 2022), une survie globale médiane atteignant 18 mois a été rapportée, avec des taux de survie globale de 39,8 % à deux ans et de 31,5 % à trois ans après implantation, contre une survie médiane généralement comprise entre 14 à 15 mois sous traitement standard (Stupp et al. 2001). Ces résultats illustrent l'intérêt clinique d'une délivrance locale prolongée dans un contexte où l'infiltration diffuse des cellules tumorales dans la parenchyme cérébral limite l'efficacité des approches systémiques.

Afin d'améliorer la distribution des agents thérapeutiques au sein du tissu cérébral, la perfusion convective (*Convection-Enhanced Delivery*, CED) a été développée (**Figure 41**) (D'Amico et al. 2021). Cette approche repose sur l'administration continue sous pression positive via des microcathéters implantés dans le parenchyme, générant un flux convectif permettant une distribution plus étendue que la diffusion passive seule. Cependant, malgré

des résultats précliniques et cliniques encourageants, les essais ont mis en évidence des limites persistantes, notamment une distribution hétérogène au sein des zones tumorales infiltrantes et une efficacité clinique encore insuffisante dans les formes diffuses de glioblastome (D'Amico et al. 2021; Kreatsoulas et al. 2024). Ces observations soulignent que, même en contournant les barrières de diffusion, le contrôle spatio-temporel précis de la délivrance et de la pénétration intratissulaire des agents thérapeutiques demeure un défi majeur.

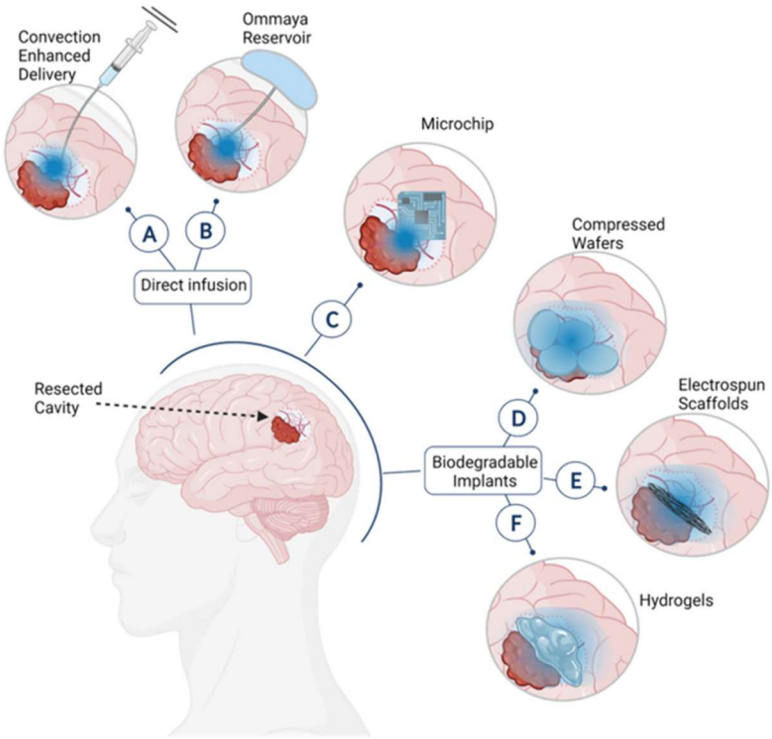


Figure 41. Principales stratégies de délivrance locale de médicaments dans le glioblastome.
Différentes approches de pharmacothérapie intracrânienne ont été développées pour améliorer l'administration locale des agents anticancéreux dans le glioblastome, notamment la délivrance par convection **(A)**, les réservoirs intraventriculaires de type Ommaya **(B)**, les microdispositifs implantables **(C)**, les implants polymériques chargés en médicament **(D)**, les échafaudages électrofilés **(E)** et les hydrogels **(F)**. *Reproduite de Pena et al. (2021).*

Dans la maladie de Parkinson, l'administration intracrânienne de dopamine a été explorée afin de reproduire une stimulation dopaminergique continue, difficile à obtenir avec les traitements oraux conventionnels. Dès les années 1980, plusieurs études cliniques ont montré qu'une perfusion intraventriculaire de dopamine pouvait améliorer les symptômes moteurs (Horne et al. 1989), mais ces effets restaient transitoires en raison d'une tachyphylaxie (diminution rapide de l'effet d'un médicament lors de doses répétées),

probablement liée à l'oxydation de la dopamine dans le liquide cérébrospinal. Afin de surmonter cette limite, une formulation anaérobie stabilisée de dopamine (A-dopamine) a récemment été développée. Chez le primate non humain rendu parkinsonien par administration de MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine), son administration intraventriculaire continue a permis une amélioration prolongée des performances motrices sans perte d'efficacité au cours du temps (Moreau et al. 2020). Plus récemment, un essai clinique de phase I réalisé chez des patients atteints de maladie de Parkinson avancée a rapporté des résultats encourageants en termes de tolérance et d'amélioration symptomatique (Moreau et al. 2025). L'intérêt d'une telle approche est également le contrôle temporel qu'elle permet d'apporter. En effet, la libération de dopamine n'est pas nécessaire en permanence. A l'échelle de la journée, elle est par exemple peu nécessaire la nuit, de la même manière que pour la stimulation cérébrale profonde. Plus intéressant encore, un système en boucle fermée permettrait de contrôler la libération de la dopamine à l'échelle de la milliseconde, comme c'est le cas de manière physiologique. Il est cependant nécessaire pour cela de trouver un biomarqueur fiable permettant de détecter quand la dopamine 'doit' être libérée pour faire fonctionner le réseau.

Au-delà de l'administration de médicaments sous forme libre, de nombreuses recherches visent désormais à encapsuler ces composés dans des systèmes de délivrance afin d'améliorer leur stabilité et contrôler leur libération locale. C'est le cas par exemple de l'acide rétinoïque, une molécule biologique lipidique de première importance pour les processus de différentiation cellulaire et qui a un intérêt thérapeutique certain, notamment pour le cerveau, mais qui nécessite d'être encapsulé pour ne pas se dégrader (Ferreira et al. 2020).

Dans la maladie de Parkinson, plusieurs systèmes ont été développés pour encapsuler la dopamine et limiter son oxydation rapide. Des nanoparticules polymériques, lipidiques et hybrides ont ainsi permis d'augmenter sa stabilité, de prolonger sa libération et maintenir plus durablement des concentrations thérapeutiques locales dans différents modèles précliniques, notamment les modèles MPTP chez la souris et le primate non humain, ainsi que les modèles lésionnels induits par 6-OHDA (6-hydroxydopamine) (Alabrahim and Azzazy 2022; Karthivashan et al. 2020; Monge-Fuentes et al. 2021; van Vliet et al. 2023). Ces travaux illustrent le potentiel des stratégies d'encapsulation pour renforcer l'efficacité des approches de délivrance intracrânienne dopaminergique (Lindner and Emerich 1998).

Dans l'épilepsie, plusieurs travaux récents explorent également l'encapsulation d'agents antiépileptiques dans des nanosystèmes pour mieux contrôler leur disponibilité locale (Movahedpour et al. 2023). Une étude a montré que des nanoparticules polymériques chargées en phénytoïne pouvaient libérer leur cargaison en réponse aux décharges épileptiformes et améliorer le contrôle des crises dans plusieurs modèles murins d'épilepsie (Wu et al. 2022). Ces résultats soulignent l'intérêt de stratégies combinant encapsulation et libération à la demande pour améliorer la précision temporelle de l'intervention thérapeutique.

Dans le glioblastome, l'encapsulation du témozolomide (TMZ) constitue aujourd'hui un axe de recherche particulièrement actif (Iturrioz-Rodríguez, Sampron, and Matheu 2023). Malgré son utilisation clinique comme traitement de référence, le TMZ présente plusieurs limites, notamment une hydrolyse rapide, une faible stabilité en conditions physiologiques et une distribution tumorale incomplète (Iturrioz-Rodríguez, Sampron, and Matheu 2023). Des nanoparticules polymériques ou lipidiques ont été développées afin d'améliorer sa stabilité, de prolonger sa demi-vie et d'augmenter son accumulation au sein de la tumeur (**Figure 42**) (Pesce et al. 2025; Şahin et al. 2025). Chez la souris, plusieurs formulations ont permis d'améliorer la survie et l'efficacité antitumorale par rapport au TMZ administré sous forme libre. Certaines approches combinent également le TMZ à d'autres agents thérapeutiques ou à des stratégies de ciblage tumoral afin de surmonter les phénomènes de résistance observés chez près de la moitié des patients atteints de glioblastome (Janjua et al. 2023; S.-S. Kim et al. 2015; Lam et al. 2018).

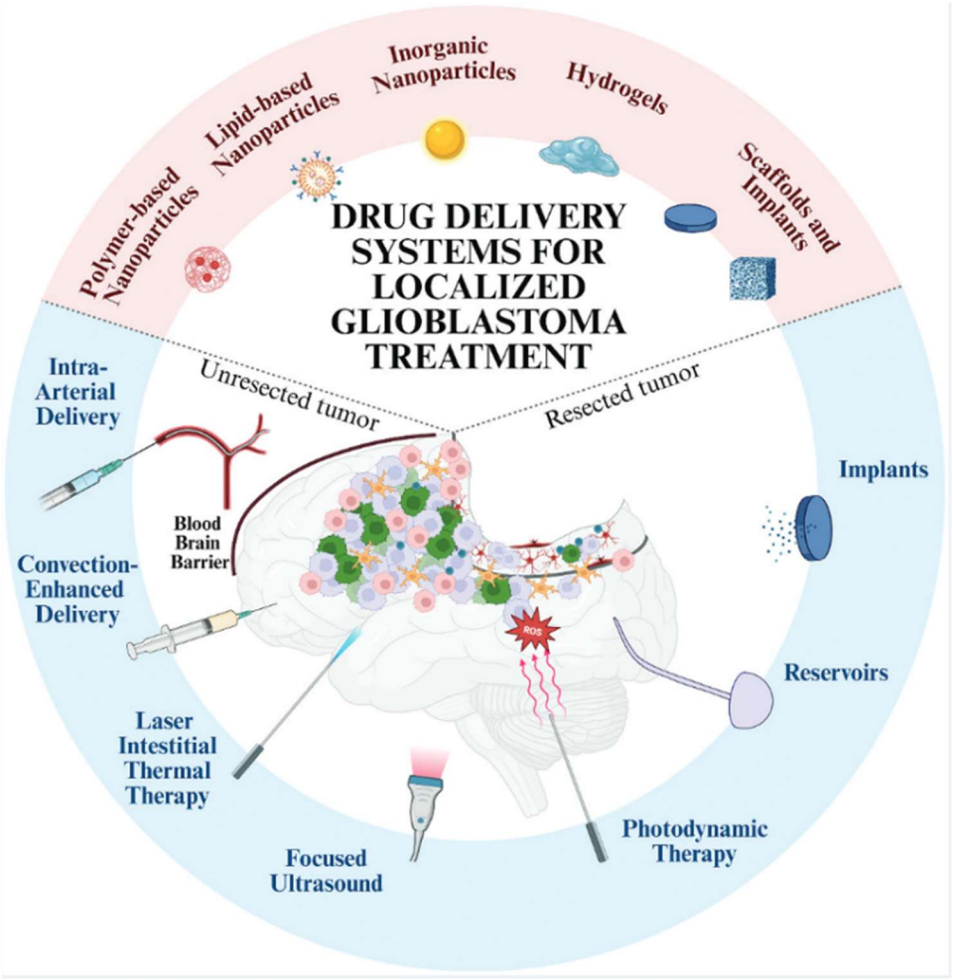


Figure 42. Approches de délivrance locale de médicaments dans le glioblastome.
Schéma illustrant différentes stratégies visant à améliorer l'administration locale d'agents thérapeutiques dans le glioblastome, incluant les techniques stéréotaxiques permettant l'accès à des tumeurs non réséquées, ainsi que les stratégies ciblant la cavité de résection tumorale et les systèmes de délivrance de médicaments conçus pour optimiser l'accumulation et la distribution des médicaments au sein du tissu tumoral. *Adaptée de Pesce et al. (2025).*

Délivrance intracrânienne d'agents biologiques thérapeutiques

Comme présenté précédemment (section **2.4.2**), de nombreux agents thérapeutiques présentent un pénétration cérébrale limitée après administration systémique en raison de leur masse moléculaire élevée et de leurs propriétés de diffusion défavorables au sein du tissu cérébrale (Gampa et al. 2026). La délivrance intracrânienne constitue ainsi une stratégie particulièrement attractive pour administrer localement ces composés au plus près de leur site d'action (Gampa et al. 2026).

Thérapie génique

Les approches de thérapie génique illustrent particulièrement l'intérêt de la délivrance intracrânienne pour l'administration d'agents biologiques thérapeutiques. Elles reposent principalement sur l'utilisation de vecteurs viraux, notamment les virus adéno-associés (AAV), capables de transférer efficacement du matériel génétique dans les cellules ciblées. Ces outils sont largement utilisés en neurosciences et constituent notamment un support majeur pour l'expression des opsines dans les approches optogénétiques présentées dans la section précédente (section **2.5.2**).

Dans un contexte thérapeutique, ils permettent également de restaurer l'expression de gènes déficitaires, de moduler l'activité de circuits neuronaux ou de réduire l'expression de gènes impliqués dans une pathologie donnée. Dans l'épilepsie pharmacorésistante, plusieurs approches de thérapie génique visent ainsi à corriger directement les mécanismes biologiques responsables de l'hyperexcitabilité neuronale. Certaines cherchent à restaurer l'activité des interneurones GABAergiques inhibiteurs, dont le dysfonctionnement favorise l'apparition des crises, notamment par l'augmentation de l'expression du gène SCN1A codant pour un canal sodique voltage-dépendant, impliqué dans le contrôle l'excitabilité neuronale (Mich et al. 2025; Turner et al. 2021). D'autres reposent sur l'expression locale du neuropeptide Y (NPY) et de son récepteur Y2 afin de diminuer la transmission excitatrice au sein des réseaux épileptogènes (Ledri and Kokaia 2026). Enfin, des stratégies ciblant le microARN miR-134 visent à limiter les remaniements synaptiques associés à l'épileptogenèse et au développement des crises récurrentes (Jimenez-Mateos et al. 2012; Ledri and Kokaia 2026). Plusieurs de ces approches ont montré une réduction significative de la fréquence des crises dans des modèles précliniques et certaines font désormais l'objet d'un développement translationnel avancé.

Immunothérapie intracrânienne

L'administration intracrânienne est également explorée pour les immunothérapies, en particulier dans le traitement des tumeurs cérébrales. Dans le glioblastome, des anticorps thérapeutiques ou des cellules immunitaires génétiquement modifiées peuvent être administrés localement pour contourner l'environnement immunosuppresseur tumoral tout en limitant les effets indésirables systémiques.

Parmi ces approches, les thérapies par cellules CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T cells*), reposant sur des lymphocytes T génétiquement modifiés pour reconnaître des antigènes tumoraux spécifiques, suscitent un intérêt croissant (Jenkins and Drummond 2024; Królikowska and Tarnowski 2025). Plusieurs essais cliniques de phase I ont démontré la faisabilité et la sécurité d'une administration intracavitaire ou intraventriculaire de ces cellules chez des patients atteints de glioblastome récidivant (Mariniello and Migliorini 2026). Un essai récent a notamment rapporté des régressions tumorales importantes après administrations intracrâniennes répétées de cellules CAR-T, illustrant le potentiel de cette stratégie pour concentrer l'activité immunitaire au sein du microenvironnement tumoral tout en limitant l'exposition immunitaire (Choi et al. 2024). Ces travaux témoignent d'une évolution du domaine vers la délivrance locale de cellules thérapeutiques directement au sein du système nerveux central.

Thérapies cellulaires

Certaines stratégies reposent également sur l'utilisation de cellules comme vecteurs thérapeutiques. Des macrophages ou des cellules souches neurales peuvent être modifiés pour transporter et libérer localement des molécules thérapeutiques au niveau des régions pathologiques du système nerveux central. Ces approches exploitent leur capacité naturelle de migration vers les sites inflammatoires ou tumoraux, permettant une délivrance ciblée d'agents actif.

Au-delà de leur rôle de vecteur, les cellules peuvent également constituer l'agent thérapeutique lui-même. Les thérapies cellulaires visent alors à restaurer des circuits neuronaux altérés par l'implantation de cellules capables de survivre, de se différencier et de s'intégrer fonctionnellement au tissu cérébral hôte. Dans la maladie de Parkinson, plusieurs essais cliniques récents ont évalué l'implantation intracérébrale de progéniteurs dopaminergiques dérivés de cellules souches pluripotentes embryonnaires ou induites (**Figure 43**) ((Doi et al. 2020; Droguerre et al. 2022; Tabar et al. 2025). Les premiers résultats rapportent une bonne tolérance, une survie des greffons et des signes préliminaires d'amélioration motrice chez certains patients. Ces approches visent à restaurer localement la transmission dopaminergique déficitaire à l'origine des symptômes moteurs de la maladie.

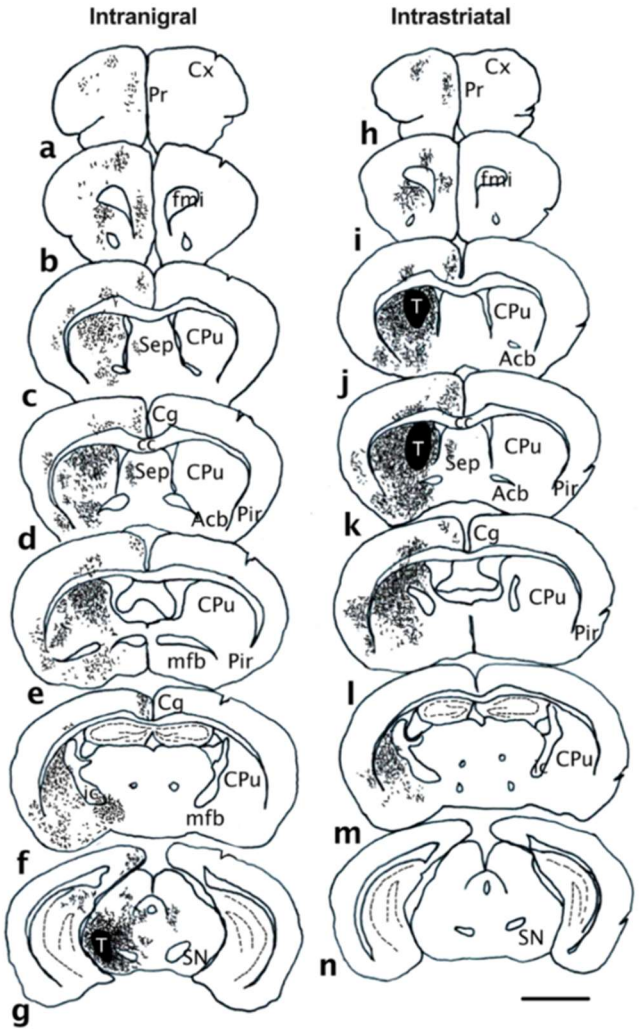


Figure 43. Intégration fonctionnelle de greffons dopaminergiques dans un modèle de maladie de Parkinson. Représentations schématiques de l'extension des fibres dopaminergiques issues de greffons implantés dans différents régions cérébrales, illustrant la capacité des cellules greffées à survivre, à se différencier et à établir de nouvelles connexions avec les circuits neuronaux hôtes. Les greffes intranigrales (a-g) et intrastriatales (h-n) conduisent à une croissance progressive des projections dopaminergiques au sein du tissu cérébral. *Reproduite de Droguerre et al. (2022).*

Ainsi, la délivrance intracrânienne ne se limite plus aux médicaments conventionnels. Elle constitue désormais une plateforme thérapeutique permettant l'administration locale de petites molécules, de biomolécules, de vecteurs génétiques et de cellules thérapeutiques. Malgré ces avancées, le contrôle précis de leur distribution dans le tissu cérébral, de leur cinétique de libération et de leur activation demeure un défi majeur. Ces limites justifient le développement de systèmes de délivrance capables d'associer administration locale et contrôle spatio-temporel de l'action thérapeutique.

2.6. DU BESOIN CLINIQUE A UNE STRATEGIE DE CONTROLE SPATIO-TEMPOREL DE L'INTERVENTION THERAPEUTIQUE

Les différentes stratégies développées pour intervenir au sein du système nerveux central apportent chacune une réponse spécifique aux contraintes associées au traitement des pathologies cérébrales. La pharmacothérapie intracrânienne permet notamment de contourner les limites imposées par la BHE en assurant une administration locale des agents thérapeutiques. Les neurotechnologies optiques offrent quant à elles un contrôle fin de l'activité neuronale avec une résolution spatiale et temporelle élevée. Enfin, les systèmes de délivrance activables permettent de protéger les molécules thérapeutiques et de conditionner leur libération à un stimulus externe.

Malgré leurs avancées respectives, ces différentes approches restent aujourd'hui principalement développées de manière indépendante et présentent encore certaines limites. Les stratégies de neurostimulation permettent une stimulation efficace des circuits neuronaux, mais leur action repose sur des mécanismes électriques ou optiques ne permettant pas directement de contrôler la délivrance locale de molécules actives. A l'inverses, les systèmes de délivrance intracrânienne assurent un accès direct au tissu cérébral, mais reposent généralement sur des mécanismes de diffusion passive limitant le contrôle spatial et temporel de la distribution des agents thérapeutiques.

Le développement de systèmes capables d'intégrer ces différentes fonctions représente ainsi un enjeu majeur pour améliorer la précision des interventions thérapeutiques dans le cerveau. Les systèmes de délivrance sensibles à des stimuli externes constituent une évolution récente afin de combiner la protection des principes actifs à une libération contrôlée à la demande. Néanmoins, leur application au système nerveux central demeure encore largement préclinique, et peu de stratégies permettent aujourd'hui d'intégrer simultanément une délivrance locale, une stabilisation prolongée de l'agent thérapeutique et un contrôle externe précis de son activation au sein du tissu cérébral.

Dans cette perspective, les approches reposant sur des systèmes photoactivables apparaissent particulièrement intéressantes, la lumière offrant un moyen de déclencher une réponse thérapeutique de manière contrôlée dans l'espace et le temps. Ces systèmes ouvrent la voie au développement de stratégies intégrant les principes de délivrance thérapeutique et de stimulation optique des fonctions cérébrales.

Afin d'illustrer les différents niveaux de contrôle offerts par les principales stratégies développées pour intervenir localement dans le système nerveux central, le **Tableau 4** compare leurs capacités respectives en termes de contrôle spatial, de contrôle temporel et de nature de l'action induite. A titre prospectif, le tableau inclut aussi le positionnement attendu des polymersomes photoactivables, dont le développement visa à combiner une action pharmacologique locale avec un déclenchement contrôlé par stimulation lumineuse.

Approche	Contrôle spatial	Contrôle temporel	Action thérapeutique
DBS open-loop	Elevé	Faible	Electrique
DBS closed-loop	Elevé	Elevé	Electrique
Optogénétique	Très élevé	Très élevé	Opto-électrique
Pharmacothérapie intracrânienne	Elevé	Faible	Pharmacologique
Polymersomes photoactivables (approches proposées)	Elevé	Elevé	Pharmacologique activable

Tableau 4. Comparaison des principales stratégies permettant un contrôle local des interventions thérapeutiques dans le système nerveux central.

OBJECTIFS ET STRATÉGIE DE LA THÈSE

1. DES POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES POUR UNE DELIVRANCE CONTROLEE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

1.1. INTERETS DE SYSTEME ACTIVABLES POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES NEUROLOGIQUES

L'étude bibliographique de ce manuscrit a mis en évidence que les stratégies thérapeutiques développées pour le système nerveux central convergent vers un objectif commun : améliorer la précision spatiale et temporelle des interventions au sein du cerveau. Les neurotechnologies, comme la stimulation cérébrale profonde ou l'optogénétique, permettent aujourd'hui de moduler sélectivement l'activité de circuits neuronaux avec un haut niveau de précision. A l'inverse, les approches de pharmacothérapie intracrânienne permettent une administration locale de molécules thérapeutiques au plus près des tissus ciblés, mais restent souvent limitées par un contrôle insuffisant de leur distribution, de leur diffusion et de leur cinétique de libération après administration.

Cette dichotomie entre le contrôle des circuits neuronaux d'une part et délivrance pharmacologique locale d'autre part laisse une fenêtre pour un besoin thérapeutique non comblé, associant les atouts des deux approches. Il apparaît donc nécessaire de développer des systèmes capables d'associer l'encapsulation (protection des agents thérapeutiques), à une délivrance locale (précision spatiale) et à un contrôle externe de leur activation (précision temporelle). Dans cette perspective, les systèmes de délivrance sensibles à un stimulus externe représentent une approche particulièrement intéressante. Leur principe repose sur la possibilité de maintenir une molécule thérapeutique sous une forme inactive ou confinée après administration, puis de déclencher sa libération à la demande au niveau du site d'intérêt. Parmi les différents stimuli, la lumière apparait particulièrement adaptée aux applications cérébrales en raison de son utilisation déjà très importante en recherche préclinique et de sa capacité à fournir une résolution spatiale et temporelle élevée.

1.2. LA LUMIERE COMME STIMULUS THERAPEUTIQUE

L'intérêt de la lumière pour les applications cérébrales repose notamment sur les avancées majeures réalisées dans le domaine des neurotechnologies. L'optogénétique a démontré qu'un stimulus lumineux pouvait être utilisé pour contrôler sélectivement l'activité de populations neuronales définies avec une résolution spatio-temporelle élevée.

Parallèlement, le développement de fibres optiques implantables, de micro-LED miniaturisées et de dispositifs photoniques intégrables a permis d'envisager une stimulation lumineuse précise et moins invasive au sein de structures cérébrales profondes (Segev et al. 2017). Bien que ces technologies aient initialement été conçues pour la neurostimulation, elles démontrent plus largement la faisabilité d'un contrôle optique direct dans le tissu cérébral. Cette évolution ouvre la voie à un changement d'usage : au-delà de la stimulation neuronale, la lumière peut ainsi être envisagée comme un signal de commande permettant de déclencher localement la libération d'agents thérapeutiques préalablement administrés (Salkho et al. 2022). Ainsi, les outils développés pour l'optogénétique et la neurostimulation constituent aujourd'hui un cadre particulièrement favorable pour le développement de systèmes thérapeutiques photoactivables.

1.3. LES POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES : INTERFACE ENTRE DELIVRANCE THERAPEUTIQUE ET NEUROSTIMULATION

Dans ce contexte, les polymersomes photoactivables représentent une stratégie prometteuse permettant d'associer les avantages des systèmes de délivrance aux possibilités offertes par les technologies optiques. Leur intérêt ne repose pas uniquement sur leur capacité d'encapsulation, mais aussi sur leur aptitude à être activés à distance par un stimulus lumineux.

Contrairement aux systèmes de délivrance conventionnels, dont la libération dépend principalement de phénomènes passifs de diffusion ou de dégradation, les polymersomes photoactivables permettent de dissocier l'administration d'une molécule thérapeutique de son activation effective. Ils peuvent ainsi être envisagés comme des plateformes dynamiques capables de convertir un signal physique externe en une réponse thérapeutique localisée. Cette propriété permet de combiner deux niveaux de contrôle complémentaires : d'une part, le transport, la protection et le confinement du principe actif après administration, et d'autre part le contrôle spatial et temporel de sa libération au sein du tissu cible.

L'intérêt d'une telle approche apparaît particulièrement marqué dans plusieurs pathologies neurologiques majeures. Dans la maladie de Parkinson, où les symptômes résultent d'un dysfonctionnement de réseaux dopaminergiques bien définis, une libération localisée de molécules neuromodulatrices au niveau des circuits des ganglions de la base pourrait permettre d'améliorer la spécificité de l'action thérapeutique tout en limitant les

effets liés à une diffusion non contrôlée. Dans l'épilepsie focale pharmaco-résistante, l'activité pathologique est souvent initiée au sein de réseaux neuronaux localisés avant de se propager à des structures cérébrales plus larges. La possibilité de déclencher localement la libération d'un agent anticonvulsivant au niveau du foyer épileptogène pourrait permettre d'intervenir directement sur les mécanismes responsables de l'initiation ou de la propagation des crises, tout en préservant l'activité physiologique des régions voisines. Dans le glioblastome, caractérisé par une forte hétérogénéité spatiale et par la présence de cellules infiltrantes au-delà de la masse tumorale visible, une activation locale de chimiothérapies encapsulées pourrait améliorer l'exposition des cellules tumorales résiduelles tout en limitant la toxicité associée à une diffusion plus large du traitement.

Les polymersomes photoactivables se situent ainsi à l'interface entre deux approches jusqu'ici largement dissociées : les neurotechnologies, qui permettent un contrôle précis de l'activité cérébrale sans délivrance pharmacologique directe, et la pharmacothérapie intracrânienne, qui assure une administration locale mais avec un contrôle limité de l'activation (**Figure 44**).

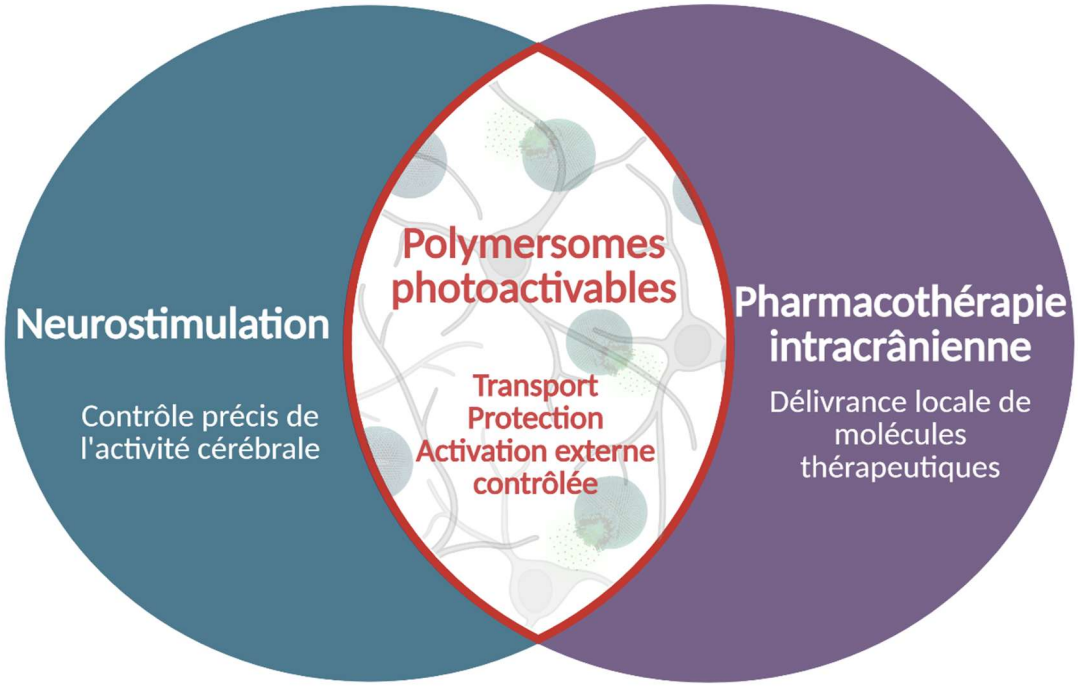


Figure 44. Stratégie proposée pour le contrôle spatio-temporel de la délivrance moléculaire dans le cerveau. Les polymersomes photoactivables combinent les fonctions d'encapsulation, de transport et de protection de molécules actives pour un contrôle externe de leur libération par photostimulation. Cette approche s'inspire des neurotechnologies pour conférer un contrôle spatial et temporel de la délivrance thérapeutique au sein du tissu cérébral. *Réalisée sur Biorender.com.*

Associés à des implants de photostimulation, ils réunissent ces deux dimensions en couplant délivrance locale et déclenchement externe de l'effet thérapeutique. Malgré les avancées réalisées dans ces domaines, aucune approche ne permet actuellement d'intégrer au sein d'un même système une délivrance locale de molécules d'intérêt, un contrôle externe, précis et à la demande de leur libération dans le tissu cérébral. Le développement de polymersomes photoactivables vise ainsi à répondre à ce verrou en combinant transport, protection et activation contrôlée de molécules actives.

2. OBJECTIFS DE LA THESE

Les travaux présentés dans cette thèse visent à **développer et à évaluer des polymersomes photoactivables permettant une délivrance contrôlée de molécules actives au sein du système nerveux central**. Ce projet repose sur trois enjeux complémentaires : **(i)** développer des polymersomes photoactivables adaptés aux contraintes d'une application dans le tissu cérébral ; **(ii)** évaluer leur biocompatibilité ; **(iii)** caractériser leur capacité à induire une photolibération efficace de molécules actives et à moduler une fonction neuronale au sein des circuits neuronaux.

DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

Le développement d'un système de photolibération reposant sur des polymersomes photoactivables et destiné à une application dans le tissu cérébral nécessite une approche multidisciplinaire, à l'interface entre la chimie et les neurosciences. La conception de ce système a été guidée par plusieurs critères visant à assurer son efficacité et sa compatibilité avec une utilisation biologique.

Les polymersomes devaient ainsi être **(i)** biocompatibles avec les cellules et tissus cérébraux, **(ii)** photoactivables de manière efficace et reproductible, **(iii)** capables d'encapsuler une quantité suffisante de composé pour permettre une photolibération fonctionnelle et induire un effet biologique mesurable, **(iv)** compatibles avec les contraintes d'injection et d'utilisation dans le tissu cérébral, notamment en termes de taille, et **(v)** suffisamment stables pour être manipulés, stockés et utilisés dans les différentes conditions expérimentales.

Ces différents critères n'étant pas nécessairement compatibles entre eux, le développement de ce système a reposé sur la recherche de compromis entre des propriétés parfois difficiles à concilier. Par exemple, certaines caractéristiques favorisant la stabilité des polymersomes peuvent limiter leur photoactivation, tandis que les contraintes liées à leur utilisation dans le tissu cérébral imposent des exigences supplémentaires en termes de taille ou de formulation. L'ensemble de ce travail a ainsi consisté à identifier un équilibre entre ces différentes contraintes afin d'aboutir à un système répondant au mieux aux objectifs du projet.

Les méthodes décrites dans ce chapitre s'articulent autour de cinq étapes principales : le développement et la caractérisation des polymersomes photoactivables, leur validation dans un modèle intermédiaire de tissu cérébral, la normalisation des paramètres de photostimulation, l'évaluation de leur fonctionnement dans le tissu cérébral *ex vivo*, puis de l'étude de leur biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*.

1. DEVELOPPEMENT ET CARACTERISATION DES POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES

1.1. FORMATION DES POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES PAR EMULSION-CENTRIFUGATION

1.1.1. Principe de l'émulsion-centrifugation

Les polymersomes géants (GUV, *Giant Unilamellar Vesicles*), dont la taille est de l'ordre de celle des cellules biologiques, sont utilisés tout au long de cette étude. Leur taille micrométrique permet leur observation individuelle par microscopie optique et constitue un modèle pertinent pour l'étude des phénomènes de photolibération avant une éventuelle transposition vers des systèmes de plus petite taille.

De nombreuses méthodes ont été développées pour produire des vésicules GUV. Initialement développées pour les lipides et la formation de liposomes, elles ont ensuite été adaptées aux copolymères amphiphiles pour permettre la formation des polymersomes (D. E. Discher and Eisenberg 2002). Ces approches sont généralement regroupées en deux grandes catégories : les méthodes sans solvants et les méthodes reposant sur un transfert de solvant. La méthode utilisée dans cette étude appartient à cette seconde catégorie (Rideau et al. 2018).

Les méthodes reposant sur un transfert de solvant utilisent des systèmes constitués d'une phase aqueuse et d'une phase organique coexistantes. Elles sont particulièrement adaptées à l'encapsulation de molécules hydrophiles. Elles nécessitent toutefois une étape d'élimination du solvant afin d'éviter toute toxicité résiduelle, toute dégradation des composés sensibles encapsulés ou toute modification des propriétés membranaires.

Parmi ces méthodes figure l'émulsion-centrifugation (**Figure 45**), une approche développée au sein du laboratoire partenaire LCPO (Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, Bordeaux) (Peyret, Ibarboure, Tron, et al. 2017a). Le principe de l'émulsion-centrifugation est de former des micelles de copolymères qu'on fait ensuite passer à travers une monocouche de copolymères amphiphiles, pour former des polymersomes dont la membrane est une bicouche et dont l'intérieur contient les molécules d'intérêt. Pour cela, les copolymères amphiphiles sont tout d'abord dissouts dans un solvant organique volatil, non miscible à l'eau et de densité inférieure à celle de l'eau, ici le toluène. Une émulsion inverse eau/huile est ensuite préparée, les gouttelettes aqueuses étant stabilisées par les

copolymères amphiphiles. Le compartiment aqueux interne est constitué d'une solution de sucrose, utilisée de préférence au glucose en raison de sa densité plus élevée à osmolarité équivalente. En parallèle, une interface biphasique huile/eau est formée, dans laquelle les copolymères s'organisent spontanément, les blocs hydrophobes étant orientés vers la phase organique et les blocs hydrophiles vers la phase aqueuse. L'émulsion inverse est ensuite déposée au-dessus de cette interface. Sous l'effet combiné de la différence de densité entre les phases et de la centrifugation, les gouttelettes traversent l'interface et acquièrent une seconde monocouche de copolymères à leur surface. Ce processus conduit à la formation d'une bicouche polymérique entourant chaque gouttelette aqueuse. Après retrait de la phase organique à l'aide d'une seringue, les polymersomes formés sont récupérés et redispersés dans une solution aqueuse fraîche.

L'encapsulation des molécules hydrophiles est réalisée lors de l'étape de formation de l'émulsion inverse. Les composés d'intérêt sont dissouts dans la phase aqueuse avant leur dispersion dans la phase organique contenant le copolymère amphiphile. Ils sont ainsi confinés dans les gouttelettes aqueuses, puis encapsulés au sein du cœur des polymersomes lors de leur formation.

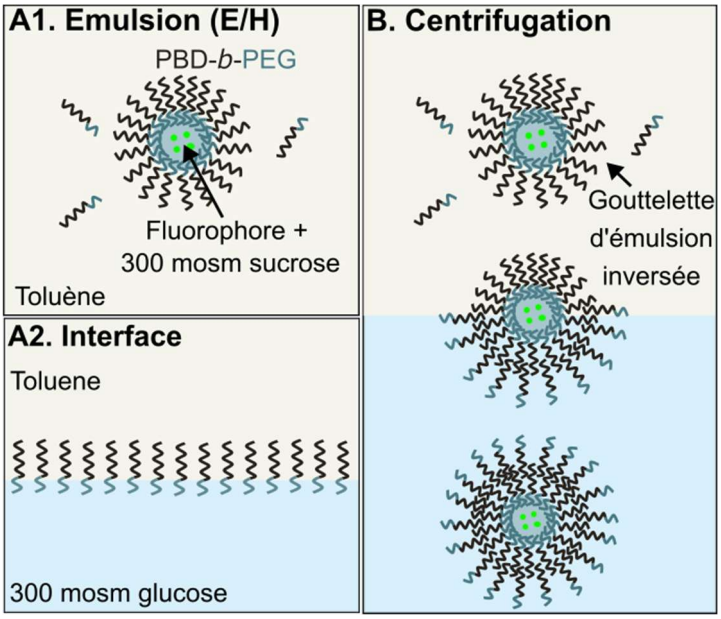


Figure 45. Schéma de principe de la formation des polymersomes par émulsion-centrifugation.
Des gouttelettes aqueuses contenant du sucrose et le fluorophore hydrophiles sont générées par émulsification dans une phrase organique (toluène) contenant le copolymère PBD-*b*-PEG dans le toluène **(A1)**. L'émulsion est ensuite déposée à l'interface entre une phase aqueuse de glucose et une phase organique contenant le même copolymère **(A2)**. Lors de la centrifugation, les gouttelettes traversent l'interface et s'assemblent en polymersomes dans la phase aqueuse inférieure, permettant l'encapsulation du fluorophore **(B)**. *Réalisée sur Inkscape.*

1.1.2. Formulation des polymersomes PBD-*b*-PEG et encapsulation de la calcéine

Dans cette étude, les polymersomes photoactivables de poly(butadiène)-*b*-poly(éthylène glycol) (PBD-*b*-PEG, fraction hydrophile 33%) sont préparés selon une adaptation de la méthode décrite par Peyret et al. (Peyret, Ibarboure, Tron, et al. 2017a). Ces formulations s'inscrivent dans la continuité des travaux antérieurs du laboratoire LCPO, dans lesquels ces polymersomes ont montré leur capacité à encapsuler des molécules hydrophiles ainsi qu'une réponse reproductible à la photostimulation.

Pour former l'émulsion inverse, 5 µL d'une solution de calcéine dissoute dans une solution de sucrose sont ajoutés à 500 µL d'une solution de PBD-*b*-PEG à 3 mg/mL dans le toluène. Le mélange est ensuite agité manuellement pendant 30 secondes afin de générer une émulsion eau/huile. L'interface huile/eau est préparée en déposant 30 µL d'une solution de PBD-*b*-PEG à 3 mg/mL dans le toluène au-dessus de 30 µL d'une solution aqueuse de glucose. Après une période de stabilisation de 30 minutes, 100 µL de l'émulsion inverse sont délicatement déposés au-dessus de l'interface, puis immédiatement centrifugés pendant 3 minutes à 1500 g à température ambiante. Après élimination de la phase organique, le culot contenant les polymersomes est redispersé dans une solution de glucose. Les expériences sont réalisées 48 heures après leur préparation. Ce délai permet à la fois l'élimination des traces résiduelles de toluène pouvant subsister après la préparation et la redispersion progressive des polymersomes initialement concentrés dans le culot de centrifugation. Les polymersomes sont ensuite conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation afin d'éviter les risques de contamination microbienne. L'osmolarité des solutions aqueuses est ajustée à 300 mOsm afin de se rapprocher des conditions physiologiques et de limiter les déséquilibres osmotiques susceptibles d'altérer la stabilité et la morphologie des vésicules lors des applications biologiques.

La calcéine est utilisée comme fluorophore photosensible en raison de sa capacité à induire la rupture contrôlée des membranes sous illumination, phénomène précédemment caractérisé au laboratoire LCPO (Peyret, Ibarboure, Tron, et al. 2017a). Les polymersomes chargés de calcéine constituent ainsi le système de référence pour l'évaluation quantitative de la photolibération. Une concentration de 10 mM est retenue, permettant une photolibération efficace et reproductible tout en réduisant la charge de fluorophore par rapport aux conditions initiales (20 mM) (Peyret, Ibarboure, Tron, et al. 2017a).

1.2. ENCAPSULATION DE FLUOROPHORES ALTERNATIFS

Outre la calcéine, différents fluorophores présentant des propriétés spectrales distinctes sont encapsulés dans les polymersomes. Les fluorophores étudiés sont le nitrobenzoxadiazole (NBD), la rhodamine B et la thiocoumarine, synthétisés au laboratoire partenaire ISM (Institut des Sciences Moléculaires, Bordeaux).

Le NBD et la thiocoumarine présentent un maximum d'excitation autour de 465 nm, compatibles avec les sources lumineuses couramment utilisées en optogénétique. La rhodamine B, excitable à 561 nm, permet l'exploration de longueurs d'onde plus élevées, généralement associées à une meilleure pénétration tissulaire.

Ces fluorophores présentent des mécanismes de photoréactivité distincts. Le NBD et la rhodamine B sont associées à des processus de type transfert d'électron photoinduit (*photo-induced electron transfer*, PET), susceptible d'induire, après excitation, des réarrangements ou fragmentation moléculaires (Beauté, McClenaghan, and Lecommandoux 2019). La thiocoumarine repose quant à elle sur un mécanisme différent de photoclivage impliquant la rupture directe d'une liaison covalente sous illumination (Beauté, McClenaghan, and Lecommandoux 2019).

Les formulations sont préparées selon le protocole émulsion-centrifugation décrit précédemment pour les polymersomes chargés en calcéine. Les fluorophores sont dissouts dans la phase aqueuse interne avant la formation de l'émulsion inverse, puis encapsulés lors de la formation des polymersomes. La concentration utilisée pour l'ensemble des fluorophores étudiés est 20 mM.

1.3. CARACTERISATION DES POLYMERSOMES

1.3.1. Observation par microscopie confocale

Les polymersomes sont observés par microscopie confocale à balayage laser afin de vérifier leur formation, leur morphologie et l'encapsulation des fluorophores. Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal inversé Leica TCS SP5 (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Allemagne) équipé d'un objectif à immersion huile HCX PL APO 63x (NA = 1,4).

Pour l'acquisition des images, environ 10 µL de suspension de polymersomes sont déposés dans des chambres à huit puits µ-Slide (Ibidi, Allemagne). Les paramètres

d'acquisition confocale sont adaptés aux propriétés spectrales de chaque fluorophore et sont résumés dans le **Tableau 5**.

Fluorophore	Laser d'excitation	Puissance (%)	Fenêtres d'émission (nm)
Calcéine	Argon 488 nm	10	495 - 555
Thiocoumarine	Argon 458 nm	20	460 - 550
NBD	Argon 458 nm	40	470 - 550
Rhodamine B	DPSS 561 nm	20	570 - 640

Tableau 5. Paramètres d'acquisition en microscopie confocale à balayage laser des polymersomes selon les fluorophores utilisés.
Les longueurs d'onde d'excitation correspondent aux réglages du microscope confocal (LAS X, Leica Microsystems) et peuvent différer des maxima d'excitation propres aux fluorophores. Les puissances laser sont exprimées en pourcentage du réglage logiciel du système confocal (AOTF, *acousto-optic tunable filter*), 100 % correspondant à la transmission maximale de la source laser sélectionnée.

Les images sont acquises à l'aide du logiciel LAS X (Leica Microsystems) avec une résolution de 512 x 512 pixels et un moyennage de ligne (*line average*) compris entre 4 et 8 afin d'améliorer le rapport signal/bruit. Les acquisitions sont ensuite exportées pour analyse sous FIJI (Image J, version 1.54).

1.3.2. Détermination de la taille des polymersomes

La détermination du diamètre moyen des polymersomes chargés de calcéine est réalisée à l'aide du logiciel QuPath (version 0.5.1). Les images confocales obtenues après formulation par émulsion-centrifugation sont importées dans le logiciel puis une région d'intérêt (ROI) est définie manuellement. Les polymersomes sont ensuite détectés à l'aide d'un algorithme de segmentation basé sur l'outil *Object classification / Cell detection*. Les paramètres de détection sont ajustés afin d'identifier les polymersomes tout en limitant la détection d'artefacts et de structures non spécifiques. Chaque détection est validée visuellement. Une sélection supplémentaire est appliquée à partir de l'indice de circularité calculé par QuPath. Seuls les objets présentant une circularité supérieure à 0,8 sont retenus pour l'analyse afin de ne conserver que les structures compatibles avec des vésicules sphériques et d'exclure les objets irréguliers ou agrégés. L'aire projetée de chaque polymersome est extraite à l'aide de la fonction *Measure → Show detection measurements* puis exportée au format Excel. Le diamètre équivalent est ensuite calculé à partir de cette aire

en supposant une géométrie circulaire selon la relation $D = 2\sqrt{(A/\pi)}$, où A correspond à l'aire mesurée. Cette analyse est réalisée sur un total de 1265 polymersomes provenant de 6 formulations indépendantes (n = 1265, 6 batches) et les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM.

1.3.3. Détermination de la concentration des polymersomes

La concentration des polymersomes chargés de calcéine est déterminée par un comptage manuel à l'aide d'un microscope à épifluorescence Eclipse E400 (Nikon) équipé d'une source lumineuse pE-300 (CoolLED). Afin d'éviter toute photostimulation accidentelle des polymersomes durant le comptage, la puissance est fixée à 1 %. La suspension de polymersomes est homogénéisée puis son volume total est mesuré à l'aide d'une micropipette P1000. Le comptage est réalisé à l'aide d'une lame de numération Fast Read 102 (Biosigma, BVS100), chaque chambre étant remplie de 7 µL de suspension. Le nombre de polymersomes par microlitre est calculé selon l'équation :

Équation 3

$$\text{Nombre de polymersomes/(µL)} = \frac{\text{Nombre total de polymersomes comptés}}{\text{Nombre de grands carrés}} \times \text{Facteur de dilution} \times 10$$

Cette analyse est réalisée sur un total de 24 formulations indépendantes (n = 24 batches) et les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM.

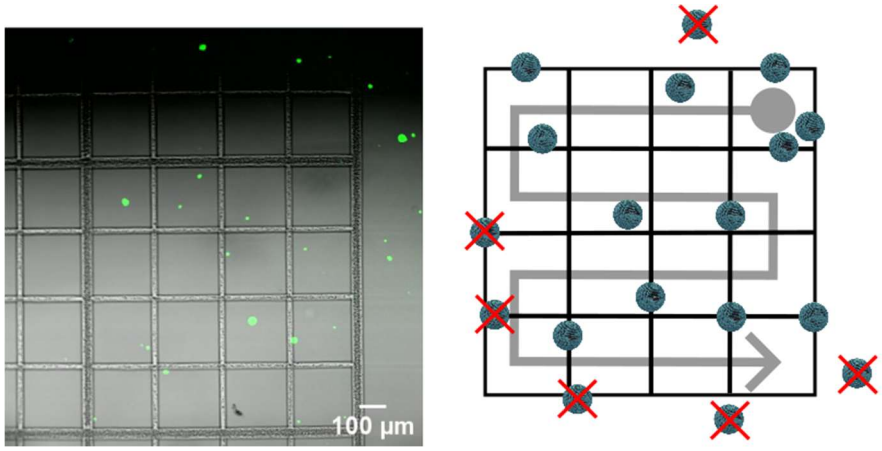


Figure 46. Détermination de la concentration des polymersomes par comptage sur chambre de Malassez. A gauche : image confocale montrant les polymersomes fluorescents (vert) superposés à l'image en transmission de la grille de comptage. Les polymersomes sont répartis au sein du quadrillage utilisé pour la quantification. A droite : représentation schématique d'un carré de comptage (1 x 1 mm) de la chambre Fast-Read 102, subdivisé en 16 sous-carrés de 0,25 mm de côté. Les règles de comptage appliquées sont les suivantes : les polymersomes entièrement inclus dans le carré ou touchant les bords supérieur et droit sont comptabilisés, tandis que ceux situés sur les bords inférieur et gauche sont exclus afin d'éviter tout double comptage. *Réalisée sur Inkscape.*

1.4. PHOTOSTIMULATION DES POLYMERSOMES EN SOLUTION

1.4.1. Dispositif expérimental

La photostimulation en solution des polymersomes chargés de calcéine est réalisée à l'aide d'un microscope confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim) équipé d'un module FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*). Ce module est utilisé comme système d'illumination laser permettant une stimulation localisée des régions d'intérêt (ROI) définies par l'utilisateur.

1.4.2. Protocole de photostimulation

Pour chaque expérience, une ou plusieurs régions d'intérêt (ROI) sont définies autour des polymersomes sélectionnés. Le protocole de photostimulation comprend trois étapes successives : une phase pré-stimulation constituée en l'acquisition de 10 images à faible puissance (5%) afin de déterminer l'intensité de fluorescence initiale ; une phase de stimulation est réalisée par illumination des ROI à puissance maximale (100 %) ; et une phase de suivi au cours de laquelle l'évolution du signal est enregistrée à faible puissance (5%) afin de limiter le photoblanchiment lié à l'observation.

Les acquisitions sont réalisées avec une taille d'image de 256 x 256 pixels et un balayage bidirectionnel à une fréquence de ligne de 1400 Hz. Le diaphragme confocal (pinhole) est fixé à 2 unités Airy. Des expériences contrôles sont réalisées dans des conditions identiques, à l'exception de la phase de stimulation, pour laquelle la puissance laser était maintenue à 0%.

1.4.3. Détermination du temps moyen de rupture

Le temps de rupture des polymersomes est déterminé à partir des séries temporelles acquises lors des expériences de photostimulation. Il est défini comme l'intervalle entre le début de l'illumination et la disparition du signal fluorescent intravésiculaire. Les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel FIJI (ImageJ, version 1.54). Cette analyse est réalisée sur un total de 41 polymersomes provenant de 6 formulations indépendantes (n = 41, 6 batches) et les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM.

1.5. POLYMERSOMES POUR LA PHOTOLIBERATION DU CNQX

1.5.1. Co-encapsulation de la calcéine et du CNQX

Le CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, sel disodique hydraté) est utilisé comme molécule d'intérêt pour les expériences de photolibération car le CNQX est un antagoniste compétitif des récepteurs AMPA/Kainate très reconnu, dont l'effet sur la transmission neuronale peut être quantifié par électrophysiologie. Les polymersomes chargés de la calcéine et du CNQX sont préparés selon le protocole d'émulsion-centrifugation décrit précédemment.

Pour chaque formulation, 2,5 µL de solution de calcéine et 2,5 µL de solution de CNQX préparées dans le sucrose à 300 mOsm sont ajoutés à 500 µL de solution de PBD-*b*-PEG dans le toluène avant l'étape d'émulsification. Le volume aqueux total est ainsi maintenu à 5 µL. Le CNQX est utilisé sous forme de sel disodique afin d'assurer sa solubilisation dans la phase aqueuse interne. Le CNQX est introduit dans la phase aqueuse interne à une concentration initiale de 100 µM. Cette concentration est choisie car elle 10 fois supérieure aux conditions couramment utilisées pour l'inhibition des récepteurs AMPA lors des enregistrements électrophysiologiques ex vivo. Sa libération locale vise à induire une diminution de la

transmission synaptique excitatrice, permettant de fournir une lecture fonctionnelle directe de l'efficacité du système de photolibération.

1.5.2. Caractérisation et photostimulation

Les polymersomes co-encapsulant la calcéine et le CNQX sont caractérisés par microscopie confocale selon le protocole décrit en section **1.3.1**. Leur diamètre est déterminé selon la procédure décrite en section **1.3.2**. La photostimulation est réalisée selon le protocole présenté en section **1.4.2** et les séries temporelles sont analysées sous FIJI (ImageJ, version 1.54).

2. VALIDATION DANS UN MODELE INTERMEDIAIRE DE TISSU CEREBRAL

2.1. PREPARATION DU *BRAIN PHANTOM* A BASE D'AGAROSE

Un modèle intermédiaire de tissu cérébral (*brain phantom*) est préparé à partir d'agarose selon une adaptation de protocoles décrites dans la littérature (Rognin, Willis-Fox, and Daly 2023; Sillay et al. 2014). Une solution d'agarose à 0,8 % (m/v) est préparée dans de l'eau déionisée puis chauffé au micro-ondes jusqu'à dissolution complète. La solution est ensuite coulée dans des boites de Pétri de 35 mm de diamètre et laissée à gélifier avant conservation à 4°C (**Figure 47A**). Des tranches d'agarose de 350 µm d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un vibratome (**Figure 47B**). Cette épaisseur est choisie afin de reproduire les conditions expérimentales utilisées pour les tranches cérébrales murines destinées aux enregistrements électrophysiologiques *ex vivo*.

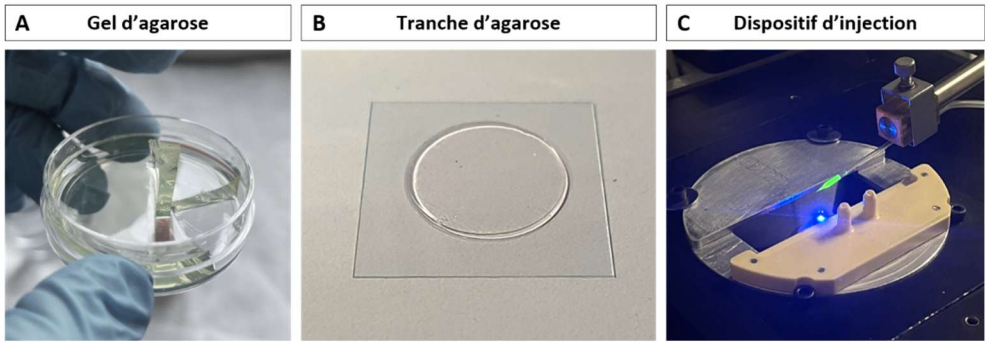


Figure 47. Préparation du modèle intermédiaire du tissu cérébral (*brain phantom*) à base d'agarose et dispositif d'injection associé.
(A) Gel d'agarose utilisé comme modèle de tissu cérébral. **(B)** Tranche d'agarose de 350 µm obtenue par vibratome. **(C)** Dispositif d'injection utilisé pour la délivrance des formulations de polymersomes au sein du gel.

2.2. DISPOSITIF D'INJECTION ET DE PHOTOSTIMULATION

Les expériences sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal inversé Leica TCS SP5 (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Allemagne) (**Figure 47C**). Les tranches d'agarose sont déposées sur une lame de microscope dans une zone délimitée par un contour de vernis à ongles afin de limiter leur déplacement au cours des manipulations. Les injections sont effectuées à l'aide de micropipettes en verre borosilicaté obtenues par étirement de capillaires à l'aide d'une étireuse horizontale (les mêmes que celles utilisées pour l'électrophysiologie ex vivo, avec des paramètres d'étirement différents). L'extrémité des micropipettes est affinée à l'aide d'une microforge afin d'obtenir un diamètre interne d'environ 10 µm. Les micropipettes sont remplies à l'aide de microloaders puis fixées sur un support relié à un micromanipulateur. Une seringue de 1 mL connectée à l'extrémité arrière de la micropipette permet l'application d'une légère pression positive pour contrôler l'injection.

2.3. PROTOCOLE D'INJECTION ET DE PHOTOSTIMULATION DANS LE *BRAIN PHANTOM*

Les formulations à tester sont injectées dans les tranches d'agarose à l'aide d'un dispositif décrit précédemment. Après injection, les échantillons sont observés par microscopie confocale afin de visualiser la distribution des fluorophores ou des polymersomes au sein du gel. Les expériences de photostimulation sont réalisées directement sous microscope confocale selon le protocole décrit en section **1.4.2**. Les acquisitions d'images sont effectuées avant, pendant et après l'illumination afin de suivre l'évolution du signal fluorescent au cours des expériences.

3. NORMALISATION DES PARAMETRES DE PHOTOSTIMULATION

Afin d'assurer la comparabilité des conditions de photostimulation entre les différents modèles expérimentaux utilisés au cours de ce travail, les paramètres d'illumination sont standardisés entre les dispositifs employés pour les expériences de culture cellulaire et d'électrophysiologie.

Dans un premier temps, des polymersomes chargés en calcéine sont observés par microscopie confocale puis illuminés à l'aide de la fibre optique de 400 µm de diamètre (NA = 0,50) utilisée lors des expériences de culture cellulaire. Des illuminations de 20 s sont réalisées,

en cohérence avec les conditions retenues pour les expériences d'électrophysiologie. La puissance lumineuse est progressivement diminuée à partir de la puissance maximale disponible afin d'identifier les conditions minimales permettant encore d'obtenir une photostimulation efficace des polymersomes.

Dans un second temps, les puissances optiques délivrés par la fibre optique et par la source lumineuse pE-300 (CoolLED), utilisée lors des expériences d'électrophysiologie, sont mesurées à l'aide d'un powermètre (Thorlabs). Pour la CoolLED, les mesures sont effectuées à travers l'objectif 40x du microscope tandis que celles de la fibre optique sont réalisées à la sortie de la ferrule. Les valeurs obtenues sont ensuite normalisées par rapport à la puissance maximale délivrée la CoolLED. Ces mesures permettent d'établir une correspondance entre les niveaux de puissance délivrés par les deux dispositifs et d'exprimer les conditions d'illumination selon une échelle commune. Cette approche permet de définir des conditions de photostimulation comparables entre les différents dispositifs expérimentaux et de sélectionner des paramètres communs utilisés dans l'ensemble des expériences de culture cellulaire et d'électrophysiologie. Les valeurs normalisées (%) sont calculées selon la formule suivante :

Équation 4

$$Puissance\ normalisée = \frac{Puissance\ mesurée}{Puissance\ maximale\ \text{à}\ 100\ \%} \times 100$$

4. PHOTOSTIMULATION DES POLYMERSOMES DANS LE TISSU CEREBRAL

4.1. ANIMAUX

Les expériences électrophysiologiques sont réalisées à partir de souris C57BL/6J de sexes et d'âge variés, issues de différents protocoles expérimentaux. Ces animaux sont utilisés dans le cadre de procédures de réutilisation autorisées conformément à la réglementation en vigueur. L'ensemble des expériences est réalisé sans distinction liée au sexe ou à l'âge.

4.2. TRANSMISSION SYNAPTIQUE ET ELECTROPHYSIOLOGIE EXTRACELLULAIRE COMME LECTURE FONCTIONNELLE DE LA PHOTOLIBERATION

Dans ce travail, l'électrophysiologie extracellulaire en potentiels de champ est utilisée comme lecture fonctionnelle de la photolibération des polymersomes dans le tissu cérébral. L'électrophysiologie extracellulaire repose sur l'enregistrement des variations de potentiel générées dans le milieu extracellulaire par l'activité électrique collective d'une population neuronale. Ces signaux résultent principalement de la sommation des courants synaptiques transmembranaires associés à l'activité excitatrice du réseau neuronal. Contrairement aux approches intracellulaires, cette technique ne vise pas la caractérisation fine d'un neurone isolé, mais fournit une mesure intégrée de l'activité d'un circuit neuronal fonctionnel. En ce sens, l'hippocampe a été choisi car son organisation cellulaire permet l'enregistrement de réponses synchronisées, favorisant des potentiels de champ bien visibles et quantifiables.

Dans la voie hippocampique CA3-CA1, la stimulation électrique des collatérales de Schaffer induit l'activation synchrone des synapses glutamatergiques et la génération de potentiels de champ postsynaptiques excitateurs (fEPSPs), principalement médiés par les récepteurs AMPA. L'amplitude de ces signaux reflète directement l'efficacité de la transmission synaptique et constitue un marqueur quantitatif sensible des modulations pharmacologique ou optiques du réseau.

Dans le cadre de cette étude, l'amplitude des fEPSPs est utilisée comme lecture fonctionnelle indirecte de la photolibération du CNQX encapsulé dans les polymersomes. La libération locale de cet antagoniste des récepteurs AMPA est attendue pour entraîner une diminution de l'amplitude des fEPSPs, permettant de relier un événement de photolibération contrôlée à une réponse neurophysiologique mesurable (**Figure 48**). Ce dispositif expérimental constitue une interface fonctionnelle entre (i) un système de délivrance ciblée de molécules actives, (ii) un stimulus optique contrôlé spatialement et temporellement, et (iii) une lecture intégrée de l'activité synaptique au niveau du réseau hippocampique.

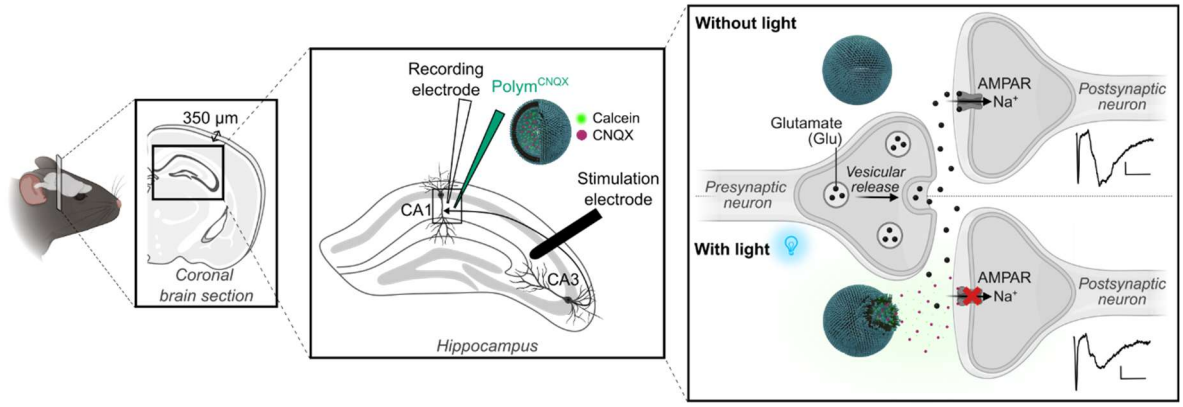


Figure 48. Principe expérimental de l'évaluation de la photolibération de CNQX par électrophysiologie extracellulaire dans la voie hippocampique CA3-CA1.
Une électrode de stimulation est placée dans la région CA3 afin d'activer les collatérales de Schaffer, tandis qu'une électrode d'enregistrement extracellulaire est positionnée dans la région CA1 pour mesurer les potentiels de champ postsynaptiques excitateurs (fEPSPs). Les polymersomes contenant du CNQX sont appliquées à proximité du site d'enregistrement et soumis à une illumination à travers l'objectif du microscope. La photolibération du CNQX est attendue pour bloquer les récepteurs AMPA du glutamate et induire une diminution de l'amplitude des fEPSPs.

4.3. PREPARATION DES TRANCHES DE CERVEAU AIGUËS

Afin d'assurer des enregistrements électrophysiologiques robustes et reproductibles, une attention particulière est portée à la préservation de l'organisation synaptique de la voie hippocampique CA3-CA1, modèle classiquement utilisé pour l'étude de la transmission glutamatergique. La qualité des réponses synaptiques dépend de l'orientation du tissu lors de la coupe. Afin de standardiser ce paramètre, un support d'orientation est utilisé lors de la préparation des tranches cérébrales. Ce dispositif consiste en un bloc d'agar 4 % présentant une surface inclinée à 5°, permettant d'imposer un angle reproductible lors du positionnement du cerveau sur le vibratome. Cette configuration permet d'assurer une orientation anatomique constante du tissu lors des coupes coronales.

Les expériences sont réalisées sur des tranches aiguës d'hippocampe de souris. Les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane puis euthanasiés par décapitation. Le cerveau est rapidement extrait et débarrassé du cervelet et des bulbes olfactifs afin de faciliter son positionnement. Il est ensuite monté sur le bloc d'agar préalablement fixé à la platine du vibratome, la face caudale étant appliquée sur le support et la face dorsale orientée vers la partie la plus épaisse du gel. Les tranches hippocampiques (350 µm d'épaisseur) sont obtenues à l'aide d'un vibratome (VT1000S, Leica Microsystems). Pendant la coupe, le tissu est maintenu immergé dans une solution de liquide céphalorachidien artificiel (ACSF) supplémenté en sucrose (HS pour haut sucrose), glacé et continuellement oxygénée (95 % O_2 /

5 % CO_2), afin de préserver au mieux la viabilité tissulaire. La solution HS-ACSF contient (en mM) : 125 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 25 glucose, 2,5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 1,25 NaH_2PO_4 et 3 pyruvate, avec 75 mM sucrose. Les tranches sont ensuite incubées pendant 1 h à 34 ° C dans une solution ACSF oxygénée (sans sucrose), puis maintenues à température ambiante jusqu'aux enregistrements. La solution d'ACSF utilisée pour la conservation et les enregistrements contient (en mM) : 125 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 25 glucose, 2,5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 1,25 NaH_2PO_4, et était continuellement oxygénée.

4.4. INSTALLATION ELECTROPHYSIOLOGIQUE ET ACQUISITION DES DONNEES

4.4.1. Chambre d'enregistrement

Les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés dans une chambre d'enregistrement montée sur un microscope droit à fluorescence (Nikon FN1). Les tranches sont perfusées en continu avec une solution d'ACSF oxygénée (95 % O2 / 5 % CO2) à un débit de 3 à 4 mL/min à l'aide d'une pompe péristaltique (Gilson, Minipulse 3). La température est maintenue à 30 °C grâce à un système de contrôle thermique (Warner Instruments, TC-324B). Cette température a été retenue car elle permet de préserver au mieux les processus métaboliques et les propriétés physiologiques du tissu cérébral tout en assurant la stabilité des enregistrements sur de longues durées.

4.4.2. Stimulation et enregistrements extracellulaires des fEPSPs

Les potentiels de champ postsynaptiques excitateurs (fEPSPs) sont enregistrés dans le stratum radiatum de la région CA1 à l'aide de micropipettes en verre borosilicaté remplies d'ACSF (**Figure 48, Figure 49**). Les micropipettes sont maintenues par des porte-électrodes montés sur des bras micromanipulateurs commandés par microcontrôleurs, permettant leur positionnement précis au sein de la tranche cérébrale. Les portes-électrodes sont reliés au préamplificateur par des électrodes argent/chlorure d'argent en contact avec la solution d'ACSF contenue dans les micropipettes. Les électrodes d'enregistrement sont positionnées à proximité du site de stimulation afin d'obtenir des réponses synaptiques stables et reproductibles (**Figure 48, Figure 49**). L'amplitude des fEPSPs est utilisée comme indicateur de l'efficacité de la transmission synaptique et sert de mesure quantitative de la photolibération du CNQX à partir des polymersomes (**Figure 48, Figure 49**).

Les réponses synaptiques sont évoquées par stimulation électrique des collatérales de Schaffer provenant de la région CA3 à l'aide d'une électrode bipolaire concentrique (Phymep) reliée à un stimulateur programmable (World Precision Instruments, A365) (**Figure 48, Figure 49**). L'intensité de stimulation est ajustée individuellement pour chaque coupe afin d'obtenir des réponses stables tout en évitant le recrutement maximal des fibres afférentes. Cette configuration permet l'enregistrement des fEPSPs générés par l'activation synchrone des synapses glutamatergiques de la voie hippocampique CA3-CA1.

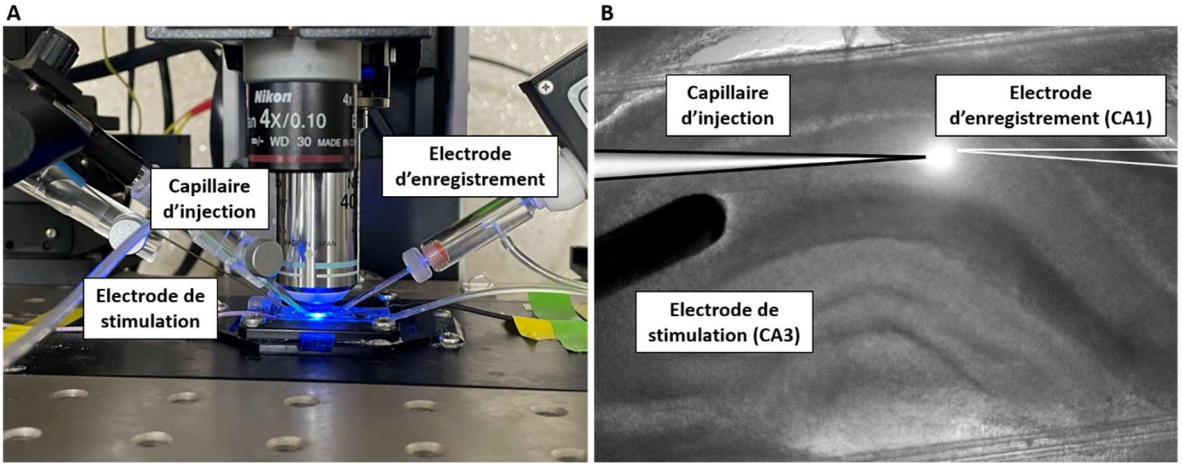


Figure 49. Configuration du dispositif d'injection et d'enregistrement électrophysiologique utilisé pour l'étude des polymersomes photoactivables.
(A) Vue générale du montage électrophysiologique comprenant l'électrode d'enregistrement, l'électrode de stimulation et le capillaire d'injection de polymersomes. **(B)** Représentation d'une tranche hippocampique avec positionnement des électrodes de stimulation dans la région CA3, de l'électrode d'enregistrement dans la région CA1 et du capillaire d'injection à proximité du site d'enregistrement.

4.4.3. Acquisition et analyse des données

Les signaux électrophysiologiques sont amplifiés à l'aide d'un amplificateur MultiClamp 700B (Molecular Devices), puis numérisés par l'interface Digitada 1440B (Molecular Devices). Les acquisitions sont réalisées à l'aide du logiciel pClamp 10.7 (Molecular Devices). Les données sont analysées hors ligne avec le logiciel Clampfit 11.2 (Molecular Devices). Les amplitudes des fEPSPs sont mesurées avant, pendant et après la photostimulation afin d'évaluer les effets de la photolibération. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (versions 10 et 11). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM.

4.5. PROTOCOLE DE PHOTOSTIMULATION DES POLYMERSOMES DANS LES TRANCHES HIPPOCAMPIQUES

Afin d'évaluer la photolibération des polymersomes dans le tissu cérébral, des formulations co-encapsulant la calcéine et du CNQX sont utilisées. Il est attendu du CNQX, antagoniste des récepteurs AMPA, qu'il induise une diminution de l'amplitude des fEPSPs enregistrés dans la voie CA3-CA1 lors de sa libération locale. Cette approche permet ainsi de convertir un événement de photolibération en une modulation fonctionnelle mesurable de la transmission synaptique.

Les polymersomes sont appliqués localement à proximité du site d'enregistrement afin de garantir une exposition contrôlée et spatialement restreinte du tissu (**Figure 48**). Les formulations sont injectées directement dans les tranches hippocampiques à l'aide de micropipettes en verre borosilicaté, sous contrôle visuel.

La photostimulation est réalisée à l'aide d'une source LED (pE-300, CoolLED), couplée au microscope et délivrée à travers un objectif à immersion 40x. L'illumination est appliquée pendant 20 s, correspondant à la durée d'un sweep d'acquisition. Les réponses électrophysiologiques sont enregistrées avant, pendant, et après illumination afin de suivre la dynamique de modulation de la transmission synaptique.

Des expériences contrôles sont réalisées dans les mêmes conditions expérimentales en absence de photostimulation ou en présence de formulations ne contenant pas de molécule active, afin d'évaluer les effets spécifiques liées à la photolibération.

5. EVALUATION DE LA BIOCOMPATIBILITE

5.1. EVALUATION *IN VITRO* DE LA CYTOTOXICITE DES POLYMERSOMES

En parallèle du développement et de la validation fonctionnelle des polymersomes, une étape essentielle consiste à évaluer leur compatibilité biologique dans des contextes de complexité croissante, depuis des systèmes cellulaires *in vitro* jusqu'au tissu cérébral *in vivo*. Cette analyse vise à garantir l'absence d'effets cytotoxiques significatifs tout en identifiant les contraintes associées à leur utilisation, en particulier dans des conditions d'administration et de suivi *in vivo*.

Dans un premier temps, des tests exploratoires de cytotoxicité ont été réalisés sur des lignées cellulaires M17 en collaboration avec Benjamin Dehay et Rémi Kinet (IMN, Bordeaux

Neurocampus), afin d'évaluer la toxicité intrinsèque des polymersomes, avec ou sans fluorophores (calcéine ou thiocoumarine).

Dans un second temps, la biocompatibilité a été étudiée sur des cultures primaires corticales de souris, modèle le plus proche de la physiologie neuronale. Ces expériences permettent d'évaluer l'impact des formulations photoactivables encapsulant le CNQX sur la viabilité cellulaire dans des conditions contrôlées, incluant ou non la photostimulation. Elles constituent une étape intermédiaire essentielle avant les expérimentations sur tissu cérébral.

5.1.1. Préparation des cultures primaires corticales

Les cultures primaires sont préparées à partir de souris C57/Bl6J âgées de 0 jour postnatal (P0). Les souriceaux sont euthanasiés par décapitation et le cerveau est rapidement extrait de la boîte crânienne. Les deux hémisphères sont séparés, et les hippocampes ainsi que les méninges sont retirés afin d'isoler le cortex cérébral. Les cortex sont découpés en fragments puis incubés dans une solution de papaïne (0,4 mg/mL) pendant 15 min à 37 °C. Cette digestion enzymatique permet la dissociation de la matrice extracellulaire et facilite l'obtention d'une suspension cellulaire. Une solution de DNase est ensuite ajoutée pendant 5 min à 37 °C afin de limiter l'agrégation cellulaire. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout d'un volume équivalent de milieu Hibernate™ supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin (FBS, *Fetal Bovine Serum*). La dissociation mécanique finale est réalisée par pipetage à l'aide d'une micropipette P1000. Les cellules sont ensuite comptées à l'aide d'un compteur cellulaire automatisé (Luna, Logos Biosystems). Les plaques de culture 96 puits sont préalablement recouvertes d'une solution de poly-L-lysine (1 mg/mL) et de laminine (3 µg/mL) pendant au moins 2 h à 37 °C afin de favoriser l'adhérence cellulaire. Les cellules sont ensemencées à une densité de 50 000 cellules par puits dans un milieu Neurobasal-A supplémenté avec B27+ et 10 % de FBS. Une heure après l'ensemencement, le milieu est entièrement remplacé pour éliminer les débris cellulaires et les cellules non adhérentes. Les cultures sont ensuite maintenues dans un milieu d'entretien composé de Neurobasal-A supplémenté avec B27 plus et 1,5 % de FBS. La diminution de la concentration en sérum permet de limiter la prolifération des cellules non neuronales tout en assurant la survie des neurones en culture. La moitié du milieu est renouvelée tous les 3 à 4 jours jusqu'à 14 jours *in vitro* (DIV14, 14 *days in vitro*), correspondant à l'établissement d'un réseau neuronal mature fonctionnel.

5.1.2. Exposition des cellules aux polymersomes

A DIV14, les cultures primaires sont soumises à trois séries expérimentales pour évaluer l'impact des polymersomes, de la photostimulation et de leur combinaison sur la viabilité cellulaire. Dans une première série, les cellules sont exposées à différentes concentrations de polymersomes (0, 600, 1500, 3000, 6000 et 9000 polymersomes par puits) sans illumination pour évaluer leur éventuelle toxicité intrinsèque. Dans une deuxième série, ces mêmes concentrations sont testées en présence d'illumination. Celle-ci est réalisée à l'aide d'une fibre optique de 400 µm de diamètre et d'ouverture numérique 0,5 (Thorlabs, M98L01). Les cultures sont exposées pendant 20 s à une puissance de 3,7 mW mesurée en sortie de fibre, correspondant aux conditions utilisées *in vivo*. Cette série permet d'évaluer l'impact combiné des polymersomes et de leur activation. Dans une troisième série, l'effet de l'illumination est évalué en l'absence des polymersomes, à différentes puissances (0,003 ; 3,5 ; 8,7 ; 19,3 et 30 mW) afin de déterminer une éventuelle phototoxicité. Une solution de glucose utilisée pour la formulation des polymersomes, mais dépourvue des vésicules, est utilisée comme contrôle négatif. Des solutions de DMSO à 1 % et 5 % (v/v), connues pour induire une diminution de la viabilité cellulaire, sont utilisées comme contrôles positifs. A l'issue des expositions, les cellules sont maintenues pendant 48 h à 37 °C et 5 % de CO_2 avant l'évaluation de leur viabilité.

5.1.3. Evaluation de viabilité cellulaire par test MTT

La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du test MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure (ThermoFisher, V131154). Ce test repose sur la capacité des cellules métaboliquement actives à réduire le sel de tétrazolium en cristaux de formazan, dont la quantité constitue un indicateur indirect de la viabilité cellulaire (**Figure 50**). Après 48 h, le milieu est remplacé par du milieu frais contenant le réactif MTT (10 µL par puits ; concentration finale 0,5 mg/mL). Les plaques sont incubées à 37 °C afin de permettre la formation des cristaux de formazan. Une solution de SDS-HCl (100 µL par puits ; concentration finale 50 mg/mL) est ensuite ajoutée afin de solubiliser les cristaux. Après 10 h d'incubation à 37 °C, l'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Toutes les conditions sont réalisées en triplicat.

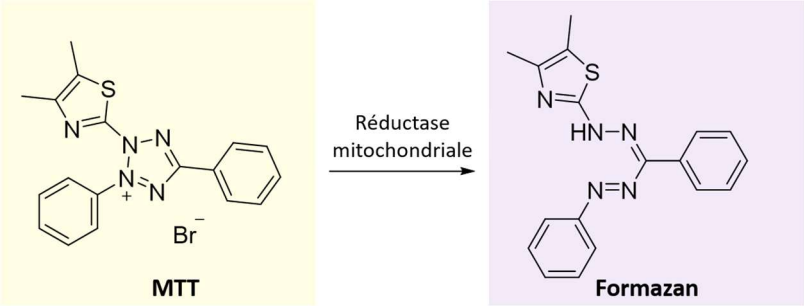


Figure 50. Réaction de réduction du MTT en formazan par l'activité mitochondriale des cellules viables. Le MTT, un composé tétrazolium jaune, est réduit par les enzymes mitochondriales des cellules viables en cristaux formazan violets insolubles. La quantité de formazan produite est corrélée à l'activité métabolique cellulaire et permet d'évaluer indirectement la viabilité cellulaire.

5.1.4. Analyse des données

Les valeurs d'absorbance à 570 nm sont utilisées comme indicateur de viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés par rapport à la condition contrôle non traitée puis exprimés en pourcentage de viabilité.

5.2. EVALUATION DE LA TOLERANCE ET OPTIMISATION DES STRATEGIES DE DETECTION *IN VIVO*

Cette section regroupe l'ensemble des expériences *in vivo* visant à évaluer la tolérance des formulations de polymersomes dans le tissu cérébral, ainsi qu'à optimiser leur détection et leur suivi après injection. L'ensemble des conditions expérimentales est organisé selon des formulations définies (**Tableau 6**) et des cohortes animales distinctes (**Tableau 7**), permettant de relier chaque configuration expérimentale aux analyses histologiques et d'imagerie correspondantes.

5.2.1. Présentation des formulations de polymersomes

Quatre formulations de polymersomes (F1 à F4) sont utilisées au cours des expérimentations *in vivo* afin d'évaluer leur détection et leur tolérance dans le tissu cérébral. Elles se distinguent par la nature du fluorophore encapsulé, la présence d'un marquage membranaire, ainsi que par leurs conditions de préparation, notamment l'utilisation ou non d'une étape d'extrusion. Les caractéristiques des différentes formulations sont résumées dans le **Tableau 6**. Après préparation, les différentes formulations sont conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation pour les études *in vivo*.

Code formulation	Fluorophore encapsulé	Marquage membranaire	Extrusion	Objectif principal
F1	Thiocoumarine	Rhodamine B	Non	Détection initiale
F2	Cyanine 5	-	Non	Amélioration contraste
F3	-	Cyanine 5.5	Non	Marquage membranaire
F4	-	Cyanine 5.5	Oui (1 µm)	Réduction de la taille

Tableau 6. Synthèse des formulations de polymersomes utilisés dans les expériences *in vivo.*

F1 : Polymersomes chargés de thiocoumarine et marqués à la rhodamine B

La formulation F1 correspond à des polymersomes encapsulant de la thiocoumarine et présentant un marquage membranaire par un copolymère PBD-*b*-PEG fonctionnalisé à la rhodamine B. Elle est développée dans le cadre des premières études *in* vivo en raison des propriétés photosensibles de la thiocoumarine et de son maximum d'excitation situé autour de 465 nm. Le marquage membranaire par rhodamine B permet la localisation des polymersomes après injection intracérébrale. Le copolymère PBD-b-PEG-RhB est obtenu auprès de Polymer Source (Montréal, Canada) et purifié par dialyse afin d'éliminer les traces de rhodamine B libre susceptibles d'interférer avec la formation des polymersomes et d'augmenter le bruit de fond. Il est incorporé à hauteur de 1 % (m/m) dans le copolymère total, à une concentration finale de 3 mg/mL dans le toluène. Les polymersomes sont ensuite préparés selon la méthode d'émulsion-centrifugation décrite précédemment.

F2 : Polymersomes chargés de cyanine 5

La formulation F2 repose sur l'encapsulation de la sulfo-cyanine 5 (Cy5), un fluorophore hydrosoluble émettant dans le rouge lointain. Cette stratégie vise à réduire l'impact de l'autofluorescence tissulaire et à améliorer le contraste en microscopie. La forme sulfonée est choisie pour sa forte solubilité en milieu aqueux et est dissoute dans la solution de sucrose utilisée pour la formation des polymersomes par émulsion-centrifugation. Contrairement à la thiocoumarine, la Cy5 ne présente pas de propriétés photosensibles et est utilisée exclusivement comme traceur fluorescent, sans rôle fonctionnel de photostimulation. La concentration encapsulée est fixée à 1 µM pour garantir une détection robuste des polymersomes par microscopie confocale.

F3 : Polymersomes marqués à la cyanine 5.5

La formulation F3 repose sur le marquage membranaire des polymersomes par incorporation d'un polymère PBD fonctionnalisé par la cyanine 5.5 (PBD-Cy5.5). Cette stratégie vise à obtenir un signal fluorescent directement associé à l'intégrité structurale des vésicules, contrairement aux formulations reposant sur l'encapsulation d'un fluorophore dans leur compartiment aqueux interne. Le choix de la cyanine 5.5 permet par ailleurs de conserver les avantages de l'imagerie dans le proche infrarouge, notamment une réduction de l'autofluorescence tissulaire et une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus biologiques.

Synthèse du polymère PBD-Cy5.5

Afin de mettre en œuvre cette stratégie, un polymère marqué à un fluorophore est synthétisé par couplage chimique de type NHS-ester entre la fonction amine du poly(1,2-butadiène), ω-amino-fonctionnalisé (PBD-NH_2, Polymer Source) et l'ester activé du fluorophore Cy5.5 NHS ester (Lumiprobe) (**Figure 51**).

Le PBD-NH_2 est dissout dans un mélange THF/DMSO, puis la N,N-diisopropyléthylamine (DIPEA) est ajoutée afin de favoriser la réaction de couplage. La solution de Cy5.5 NHS ester, préalablement dissoute dans le DMSO, est ensuite ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel. La réaction est conduite sous agitation à température ambiante pendant 24 h, à l'abri de la lumière. Le polymère fonctionnalisé est ensuite purifié par dialyse contre l'éthanol absolu à l'aide d'une membrane 1 kDa (Spectra/Por®), avec plusieurs renouvellements du bain sur quatre jours. Après purification, le produit est séché sous flux d'argon puis conservé à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation. La fonctionnalisation du polymère est vérifiée par spectroscopie RMN ^1H, en mettant en évidence les signaux caractéristiques du polymère et du fluorophore.

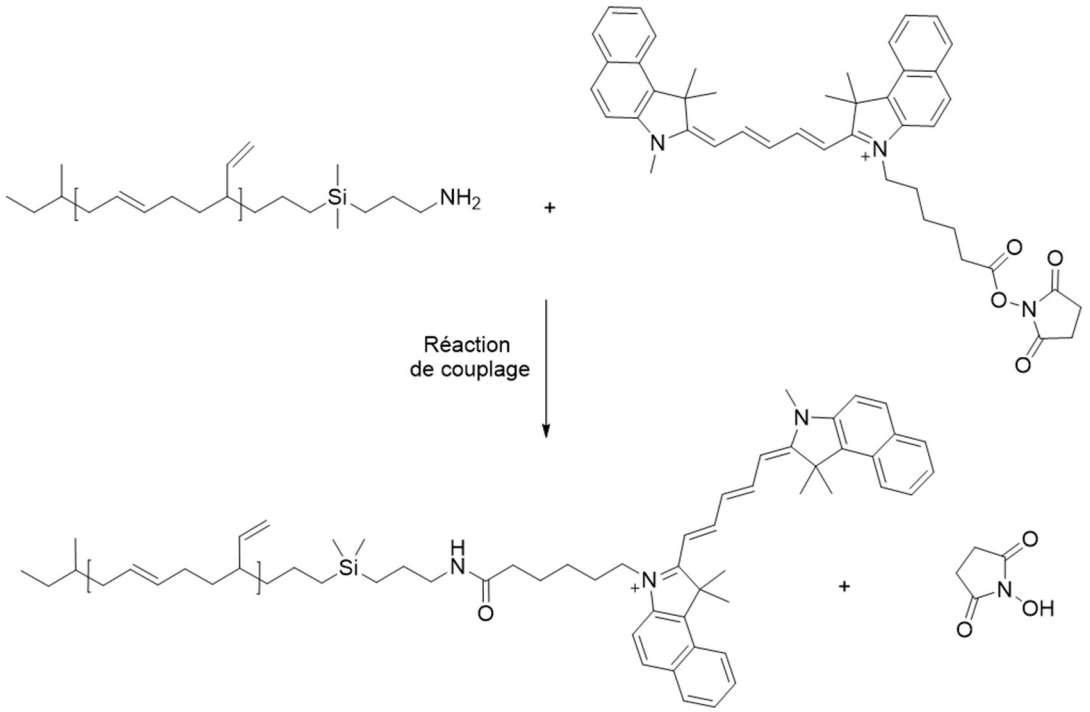


Figure 51. Réaction de couplage entre le polymère PBD-NH_2 et le fluorophore Cy5.5 NHS ester.
Couplage du PBD-NH_2 (Polymer Source, P19468-BdNH_2 avec la Cy5.5 NHS ester (Lumiprobe) par formation d'une liaison amide entre la fonction amine du polymère et l'ester activé du fluorophore. *Réalisée sur ChemDraw.*

Formulation des polymersomes par électroformation

L'ajout du polymère PBD-Cy5.5 dans les formulations obtenues par émulsion-centrifugation se révèle difficile en raison de sa solubilité limitée dans le toluène. Cette contrainte conduit à l'utilisation d'une méthode alternative reposant sur l'électroformation pour la production des polymersomes destinés aux expériences de marquage membranaire (**Figure 52**).

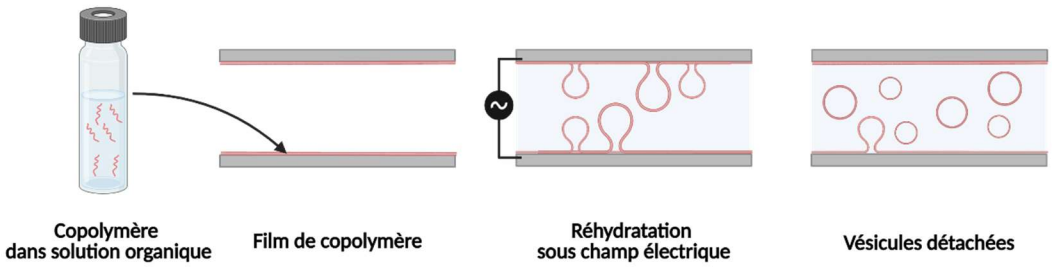


Figure 52. Représentation schématique du procédé d'électroformation des polymersomes.
La solution de copolymère est déposée sur des lames de verre recouvertes d'oxyde d'indium-étain (ITO) puis hydratée sous l'application d'une tension alternative afin d'induire la formation des vésicules.

Pour la préparation des polymersomes, le polymère PBD-Cy5.5 est mélangé au copolymère PBD-*b*-PEG à une fraction massique de 1%. Les polymères sont dissouts dans le chloroforme à une concentration totale de 1 mg/mL. La solution est déposée sur la surface conductrice de deux lames de verre recouvertes d'oxyde d'indium-étain (ITO). Après évaporation du solvant, les lames sont assemblées face à face à l'aide d'une entretoise en caoutchouc délimitant une chambre. L'ensemble est placé sous vide pendant 30 minutes afin d'éliminer les traces résiduelles de solvant. La chambre est ensuite remplie avec une solution de sucrose ajustée à 300 mOsm puis connectée à un générateur de tension alternative. Une tension sinusoïdale de 2 V à 10 Hz est appliquée pendant 1 h afin de favoriser l'hydratation du film polymérique et la formation des polymersomes. Les vésicules sont récupérées à l'aide d'une seringue de 1 mL puis préparées pour leur caractérisation par microscopie confocale.

F4 : Polymersomes marqués à la cyanine 5.5 extrudés

La formulation F4 est dérivée de F3 et intègre une étape supplémentaire d'extrusion visant à réduire la taille des polymersomes et à homogénéiser leur distribution. Cette approche repose sur l'hypothèse qu'une diminution de leur taille puisse faciliter leur visualisation et leur diffusion au sein du tissu cérébral.

Après électroformation, une première extrusion est réalisée à travers une membrane en polycarbonate de 5 µm à l'aide d'un mini-extrudeur manuel (Avanti®), afin de valider le bon fonctionnement du procédé et d'évaluer son impact sur l'intégrité des polymersomes. Une seconde extrusion est ensuite effectuée à travers une membrane de 1 µm pour réduire davantage la taille des polymersomes (**Figure 53**). Cette stratégie vise à obtenir des vésicules de plus fiable diamètre, susceptibles de présenter une meilleure diffusion au sein du tissu cérébral ainsi qu'une meilleure résistance aux contraintes mécaniques associées à l'injection, limitant ainsi les phénomènes de déformation ou de rupture des vésicules. Pour chaque étape, la solution est soumise à 21 passages successifs à travers la membrane afin d'obtenir une population de polymersomes plus homogène.

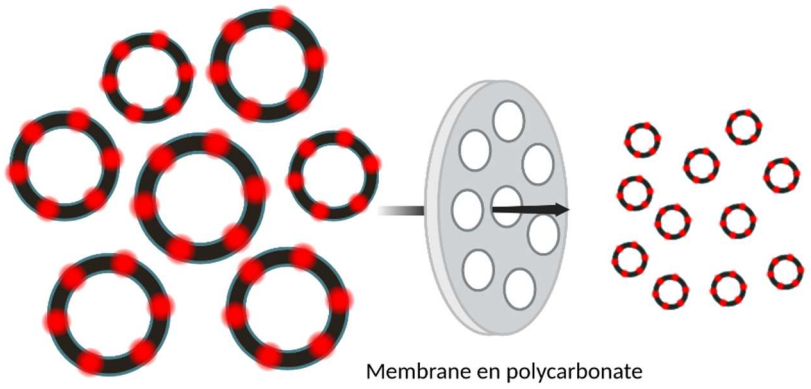


Figure 53. Représentation schématique du procédé d'extrusion des polymersomes marqués à la cyanine 5.5.
Les polymersomes obtenus par électroformation sont extrudés successivement à travers des membranes en polycarbonate de 5 µm puis 1 µm afin de réduire leur taille et d'homogénéiser leur distribution.

5.2.2. Organisation des cohortes expérimentales

Les expériences *in vivo* sont organisées en cinq cohortes expérimentales (C1 à C5), associées aux formulations décrites ci-dessus et à des objectifs expérimentaux distincts. Les principales caractéristiques de ces cohortes sont présentées dans le **Tableau 7**.

Code	Form.	N	Site	Vol. Débit	Temps	IF	Transp.	Objectif principal
C1	F1	40	Str CPF	2 µl 0.5 µl/min	J+1, J+3, J+7, J+21	Oui (n = 6/temps)	Oui (n = 4/temps)	Biodistribution
C2	F2	2	Str	2 µl 0.5 µl/min	J+3	Non	Oui	Optimisation (DISCO)
C3	F2	2	CA1	2 µl 0.5 µl/min	J+3	Non	Oui	Optimisation (CUBIC)
C4	F3	9	CA1	2 µl 0.5 µl/min	J+21	Oui	Non	Réponse gliale tardive
C5	F4	10	CA1	2 µl 0.5 µl/min	J+2	Oui	Non	Réponse gliale précoce

Tableau 7. Organisation des cohortes expérimentales *in vivo.*
Str = striatum ; CPF = cortex préfréontal ; CA1 = région CA1 de l'hippocampe ; IF = immunofluorescence ; Transp. = transparisation. Les cohortes diffèrent par la formulation de polymersomes injectés, les sites d'injection, les conditions expérimentales et les analyses réalisées, afin de couvrir les différentes étapes d'évaluation de la tolérance et de la détection *in vivo*.

Les premières expérimentations (C1 et C2) sont réalisées dans le striatum et le cortex préfrontal, dans la continuité des travaux antérieurs du laboratoire. Ces études préliminaires ont permis une première caractérisation de la tolérance des formulations en association avec des expériences d'électrophysiologie *ex vivo* (patch clamp) sur tranches cérébrales. Les

cohortes suivantes (C3 à C5) sont conduites dans l'hippocampe afin d'assurer une cohérence anatomique avec les études d'électrophysiologie *ex vivo* (field) réalisées dans le cadre de ce travail.

5.2.3. Chirurgie stéréotaxique et procédures expérimentales générales

Cette section présente les procédures chirurgicales communes à l'ensemble des cohortes expérimentales.

Les injections stéréotaxiques de polymersomes sont réalisées chez des souris anesthésiées à l'isoflurane (3,5 % pour l'induction puis 1,5 % pour le maintien, dans un flux d'oxygène à 1 L/min) par un ingénieur du laboratoire, Jean-Christophe Helbling. Une analgésie préopératoire est administrée par injection sous-cutanée de carprofène (5 mg/kg). Les animaux sont ensuite placés dans un cadre stéréotaxique (**Figure 54**) et maintenus à 37 °C sur un tapis chauffant afin de préserver leur température corporelle pendant toute la durée de l'intervention. Une craniotomie est réalisée au-dessus de la région d'intérêt. Les injections sont effectuées à l'aide d'une seringue Hamilton équipée d'une aiguille de calibre 34G, reliée à un injecteur nanolitrique (World Precision Instruments, Nanofil), à un débit constant de 0,5 µL/min. Un volume total de 2 µL de solution de polymersomes est administré par site. A l'issue de l'injection, l'aiguille est maintenue en place pendant 4 à 5 minutes afin de limiter le reflux de la solution le long du trajet d'injection, puis retirée progressivement. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées pour chaque cohorte expérimentale sont indiquées dans le **Tableau 8**.

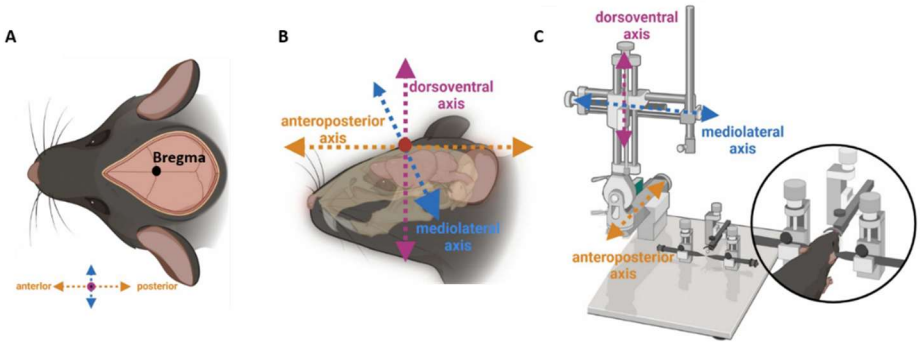


Figure 54. Repères anatomiques et appareil stéréotaxique utilisés pour les injections intracérébrales. **(A)** Localisation du bregma à la surface du crâne de souris, utilisé comme point de référence pour le reprérage stéréotaxique. **(B)** Vue latérale de la tête de souris illustrant les axes antéro-postérieur (AP), dorso-ventral (DV) et médio-latéral (ML). **(C)** Schéma d'un appareil stéréotaxique pour rongeurs permettant le positionnement précis des intruments de chirurgie er d'injection. *Adaptée de (Cecyn and Abrahao 2023).*

Cohorte	Région	AP (mm)	ML (mm)	DV (mm)
C1	Striatum	+0,86	±2,3	-2,0
C1	Cortex préfrontal	+1,8	±0,25	-1,7
C2	Striatum	+0,86	±2,3	-2,0
C3	Hippocampe CA1	-2,0	±1,3	-1,2
C4	Hippocampe CA1	-2,0	±1,3	-1,2
C5	Hippocampe CA1	-2,0	±1,3	-1,2

Tableau 8. Coordonnées stéréotaxiques des sites d'injection utilisés pour chaque cohorte.
Les coordonnées sont exprimées en milimètres (mm) par rapport au bregma selon les axes antéro-postérieur (AP), médio-latéral (ML) et dorso-central (DV).

5.2.4. Prélèvement, perfusion et conservation des tissu cérébraux

Selon la cohorte, les prélèvements cérébraux sont réalisés à différents temps post-injection (**Tableau 7**). Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'Euthasol (pentobarbital sodique, 400 mg/kg, Dechra) précédée 30 minutes avant la perfusion d'une injection sous-cutanée de buprénorphine (0,1 mg/kg, Virbac). Les animaux sont ensuite perfusés par voie intracardiaque avec une solution de PBS (phosphate-buffered saline), permettant l'élimination du sang du système vasculaire, suivie d'une solution de PFA (paraformaldéhyde) à 4 %, assurant la fixation des tissus et la préservation de leur architecture. Les cerveaux sont prélevés puis post-fixés dans du PFA 4% à 4 °C pendant 48 h avant d'être transférés dans une solution de sucrose à 30 % à 4 °C jusqu'à immersion complète. Cette étape permet une cryoprotection progressive des tissus en vue des analyses ultérieures. Après fixation, les cerveaux sont stockés selon les analyses prévues. Les cerveaux destinés aux analyse immunohistologiques sont stockés à –20°C dans une solution cryoprotectrice composée de 30 % de glycérol, 30 % d'éthylène glycol et de tampon phosphate de sodium à 0,1 M. Cette méthode permet une conservation prolongée tout en préservant l'intégrité tissulaire nécessaire aux coupes au vibratome et aux marquages immunofluorescents. Les cerveaux destinés aux expériences de transparisation sont quant à eux conservés dans du PBS contenant 0,02 % d'azide de sodium. Ce mode de conservation est privilégié afin d'éviter l'utilisation de solutions riches en polyols susceptibles d'interférer avec les étapes de clarification. L'azide de sodium permet par ailleurs de limiter la contamination microbienne tout en maintenant la compatibilité des tissus avec les protocoles de transparisation ultérieures.

5.2.5. Traitements des tissus cérébraux

Transparisation tissulaire

Des protocoles de transparisation sont mis en œuvre pour les cohortes destinées à l'imagerie tridimensionnelle de cerveaux entiers. Les expériences sont réalisées au Bordeaux Imaging Center (BIC) avec l'aide d'un ingénieur de la plateforme, Jérémie Teillon.

Pour les cerveaux issus des injections de polymersomes de formulation F1 (thiocoumarine encapsulée et marquage membranaire à la rhodamine B), un protocole de type DISCO est utilisé. Cette approche est retenue en raison de sa capacité à fournir une transparence élevée des tissus cérébraux tout en préservant de manière satisfaisante les signaux fluorescents (**Figure 55**).

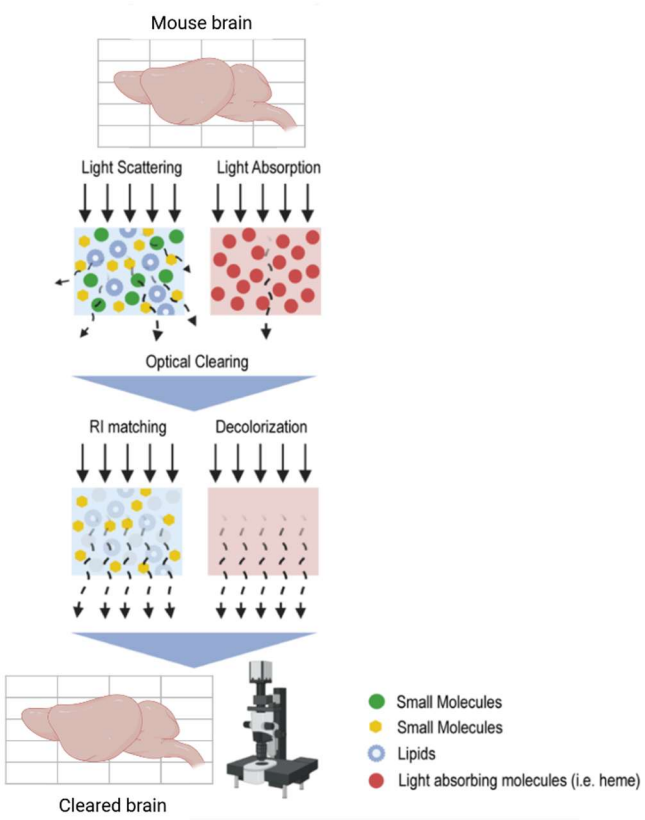


Figure 55. Principe de la transparisation du tissu cérébral.
La transparisation réduit la diffusion et l'absorption de la lumière en éliminant les lipides et en homogénéisant les indices de réfration des différents constituants du cerveau. Cette procédure améliore la pénétration de la lumière et permet l'imagerie tridimensionnelle de structures cérébrales profondes. *Adaptée de (Frenkel et al. 2023).*

Avant la clarification, les cerveaux sont lavés à plusieurs reprises dans du PBS 1X afin d'éliminer les résidus d'azide de sodium. La transparisation repose sur une déshydratation progressive au méthanol (20 %, 40 %, 60 %, 80 % et 100 %, 1h par bain), suivie d'une incubation prolongée dans du méthanol à 100 % pendant une nuit sous agitation. Une extraction lipidique est ensuite effectuée par incubation dans un mélange dichlorométhane/méthanol (66/33 %, v/v) pendant 3 h, puis par deux bains successifs de dichlorométhane pur (15 min chacun). Enfin, les échantillons sont incubés dans du dibenzyl éther, utilisé comme milieu d'adaptation d'indice de réfraction pour réduire la diffusion de la lumière et d'obtenir une transparence optique du tissu. L'ensemble du protocole est réalisé à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cerveaux transparisés sont conservés à 4 °C dans le dibenzyl éther jusqu'à leur acquisition en imagerie.

Pour les cerveaux issus des injections de polymersomes de formulation F2 (Cy5 encapsulée), un protocole de type CUBIC est utilisé. Contrairement aux approches reposant sur des solvants organiques, cette méthode de clarification en phase aqueuse est généralement mieux adaptée la préservation des fluorophores hydrosolubles et des structures biologiques fragiles. Elle est donc privilégiée afin de limiter tout altération potentielle du signal de la Cy5 ainsi que d'éventuelles modifications des structures polymériques au cours de la clarification. Les cerveaux sont incubés dans la solution de délipidation CUBIC-L à 37 °C, avec renouvellement du milieu aux jours 4, 8 et 12. Après plusieurs lavages dans du PBS, les échantillons sont successivement dans les solutions CUBIC-X1 puis CUBIC-X2 pour permettre l'appariement progressif de l'indice de réfraction et l'obtention d'une transparisation homogène du tissu. Les différentes étapes sont réalisées conformément au protocole de routine utilisé au BIC.

Immunofluorescence

Les analyses immunohistologiques sont réalisées sur des coupes coronales de 40 µm d'épaisseur obtenues au vibratome (Leica). Les tranches contenant le site d'injection sont sélectionnées puis lavées trois fois pendant 10 min dans du PBS 1X. Après une étape de blocage adaptée aux anticorps utilisés, les coupes sont incubées toute la nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage. Le lendemain, les tranches sont lavées quatre fois dans du PBS 1X puis incubées pendant 2 h à température

ambiante avec les anticorps secondaires correspondants. Après un nouveau cycle de lavages, les tranches sont montées sur lame avec un milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield ou Fluoromount-G selon les expériences). Les marqueurs immunofluorescents sont sélectionnés en fonction des objectifs propres à chaque cohorte expérimentale. Les différents anticorps utilisés sont présentés dans le **Tableau 9**.

C1					
Cible	**AC I**	**Dil.**	**AC II**	**Dil.**	**Blocage**
Neurones	DARPP-32	1/1000	IgG-Alexa 488	1/1000	1% BSA 0,15% Triton X-100 PBS
Microglie	IBA-1	1/500	IgG-Alexa 489	1/1000	10% sérum singe, 0,5% Triton X-100 PBS
Astrocytes	GFAP	1/1000	IgG-Alexa 490	1/1000	5% sérum singe, 0,3% Triton X-100 PBS
C2					
Cible	**AC I**	**Dil.**	**AC II**	**Dil.**	**Blocage**
Astrocytes	GFAP	1/1000	IgG-Alexa 488	1/1000	10% sérum singe, 0,5% Triton X-100 PBS
Microglie	IBA-1	1/500	IgG-Alexa 489	1/1000	10% sérum singe, 0,5% Triton X-100 PBS

Tableau 9. Conditions de marquage immunofluorescent pour les cohortes C1 et C1.
Les anticorps primaires (AC I) et secondaires (AC II) utilisés permettent la détection des neurones, de la microglie et des astrocytes dans les coupes cérébrales des cohortes C1 et C2.

5.2.6. Acquisition et analyse d'images

Les acquisitions sont réalisées au Bordeaux Imaging Center (BIC) à l'aide de microscopes adaptés aux objectifs de chaque cohorte expérimentale. Les cerveaux clarifiés des cohortes C1 à C3 sont analysés par microscopie de fluorescence à feuille de lumière (*Light-Sheet Microscopy*) afin d'évaluer la distribution tridimensionnelle des polymersomes dans le tissu cérébral. Les analyses immunofluorescentes de la cohorte C1 sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Leica SPE1), permettant l'étude de la localisation des polymersomes et leur éventuelle association avec différents marqueurs cellulaires. Les analyses de cohortes C4 et C5 sont réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence en champ large (Leica DM500).

Les images sont analysées sous FIJI (ImageJ v.1.54). Pour les cohortes C1 à C3, les analyses de colocalisation sont réalisées à l'aide d'une macro développée au BIC par Sébastien Marais. Les canaux correspondant aux polymersomes et aux marqueurs cellulaires sont séparés puis seuillés automatiquement avant identification des zones de colocalisation à l'aide de l'outil *Image Calculator*.

6. ANALYSE STATISTIQUE

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide de GraphPad Prism 10 et 11. La normalité des distributions est évaluée à l'aide des tests d'Anderson-Darling, d'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov. Selon la nature des données et le plan expérimental, les comparaisons sont effectuées à l'aide de test t de Student (appariés ou non appariés, paramétriques ou non paramétriques), ou par des ANOVA à un ou deux facteurs, suivies des tests post-hoc appropriés. Tous les tests sont bilatéraux, et un seuil de significativité de $p < 0,06$ est appliqué.

7. VUE D'ENSEMBLE DU PLAN EXPERIMENTAL

Afin de faciliter la compréhension de l'organisation expérimentale de ce travail, les principales étapes méthodologiques mises en œuvre sont résumées dans l'organigramme présenté en **Figure 56**. Le développement du système de polymersomes photoactivables repose une approche progressive comprenant la formulation et leur caractérisation, l'évaluation de leurs propriétés photoactivables en solution, puis leur étude dans des modèles biologiques de complexité croissante.

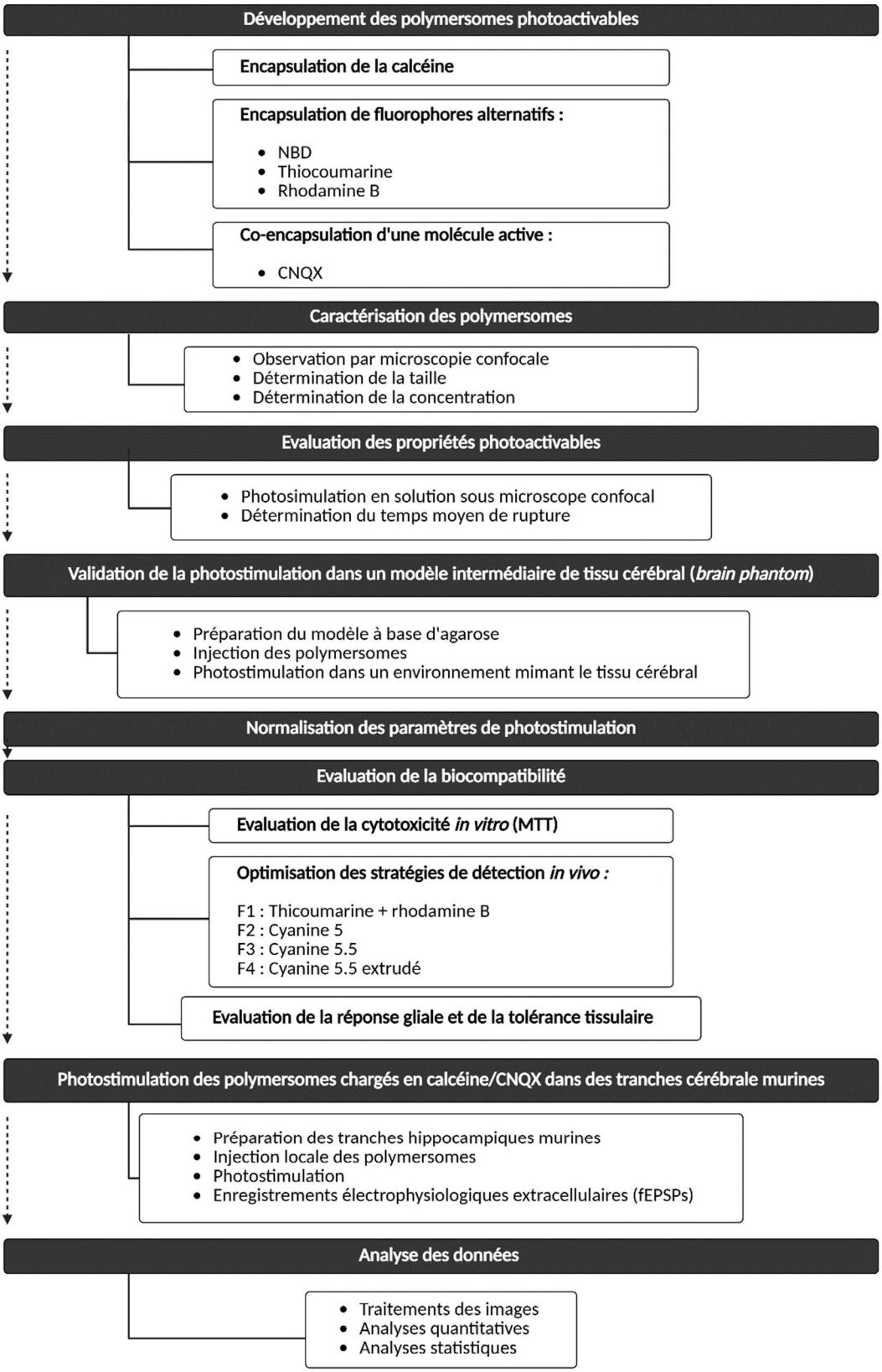


Figure 56. Schéma général de la démarche expérimentale suivie au cours de cette thèse pour le développement des polymersomes photoactivables.

RÉSULTATS

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour objectif de **développer et d'évaluer des polymersomes photoactivables destinés à la délivrance contrôlée de molécules au sein du système nerveux central**. Ce projet repose sur trois enjeux complémentaires : **(i)** le développement de polymersomes photoactivables adaptés aux contraintes d'utilisation dans le tissu cérébral ; **(ii)** l'évaluation de leur biocompatibilité ; **(iii)** la validation de leur capacité à assurer une photolibération efficace de molécules actives au sein des circuits neuronaux.

Afin de répondre à ces enjeux, les résultats obtenus au cours de cette thèse sont organisés en deux chapitres complémentaires.

Le **premier chapitre** regroupe les travaux de développement et d'optimisation réalisés au cours de la thèse. Il comprend l'évaluation de fluorophores alternatifs à la calcéine afin d'explorer la versatilité du système et sa compatibilité avec différentes molécules photoactives, la validation de la photostimulation dans un modèle intermédiaire de tissu cérébral (*brain phantom*), alors que les études antérieures avaient été réalisées exclusivement en solution, ainsi que l'optimisation des stratégies de détection *in vivo*, incluant l'adaptation des formulations aux contraintes de visualisation après injection intracérébrale. Même si ces résultats ne feront vraisemblablement pas l'objet d'une publication scientifique dans un journal à comité de lecture, il nous semblait important de les représenter et de les discuter dans ce manuscrit.

Le **second chapitre** présente les résultats obtenus avec la formulation de polymersomes photoactivables retenue pour les études biologiques. Il correspond à un article actuellement en révision et disponible sous forme de prépublication sur *Research Square*, qui décrit successivement la conception du système de photolibération, son évaluation en termes de biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*, ainsi que sa validation fonctionnelle par électrophysiologie *ex vivo* sur tranches cérébrales murines.

Cette organisation permet de distinguer les résultats des expériences de développement et d'optimisation ayant conduit à la sélection de la formulation étudiée des résultats biologiques et fonctionnelles constituant l'aboutissement du projet.

CHAPITRE 1

1. DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION

1.1. EVALUATION DE LA COMPATIBILITE DES FLUOROPHORES ET DE LEUR REPONSE A LA PHOTOSTIMULATION

Dans le cadre du développement du système de polymersomes photoactivables, plusieurs fluorophores alternatifs à la calcéine ont été évalués afin d'explorer différentes propriétés spectrales et mécanismes de photoréactivité, à savoir le nitrobenzoxadiazole (NBD), la thiocoumarine et la rhodamine B. L'objectif de cette étape était de déterminer la compatibilité de ces molécules avec les polymersomes, tant en termes d'encapsulation que de stabilité structurale, ainsi que leur capacité à induire une réponse fonctionnelle sous illumination. De plus, ces fluorophores alternatifs ont été choisis pour leur potentielle biocompatibilité et leur longueur d'onde d'excitation : 465 nm (thicoumarine et NBD) pour la compatibilité avec les systèmes d'illumination couramment utilisés en neurosciences et 561 nm (rhodamine B) pour une plus faible énergie d'activation.

Cette phase de criblage repose sur une analyse combinée de la morphologie des polymersomes par microscopie confocale et de leur réponse à la photostimulation en solution. Elle permet d'évaluer simultanément l'efficacité de l'encapsulation et le maintien des propriétés photoactives des fluorophores après leur incorporation dans les vésicules, afin d'identifier la formulation la plus adaptée aux expériences *in vivo*.

L'ensemble des fluorophores testés a pu être encapsulé dans le compartiment aqueux interne des polymersomes, démontrant la compatibilité du système avec une diversité de molécules hydrophiles activables par différentes longueurs d'onde (**Figure 57**). L'observation par microscopie confocale, combinant imagerie en fluorescence et transmission, a confirmé la formation des vésicules et permis d'évaluer leur morphologie selon les formulations. Des différences ont néanmoins été observées entre les systèmes. Les polymersomes contenant de la rhodamine B présentaient une morphologie homogène et peu agrégée, mais avec un rendement de formation global plus faible que celui observé pour les formulations chargées en calcéine, utilisées comme système de référence. Les formulations à base de NBD permettaient également la formation de polymersomes fluorescents, mais avec un rendement global inférieur à celui observé pour les formulations de référence.

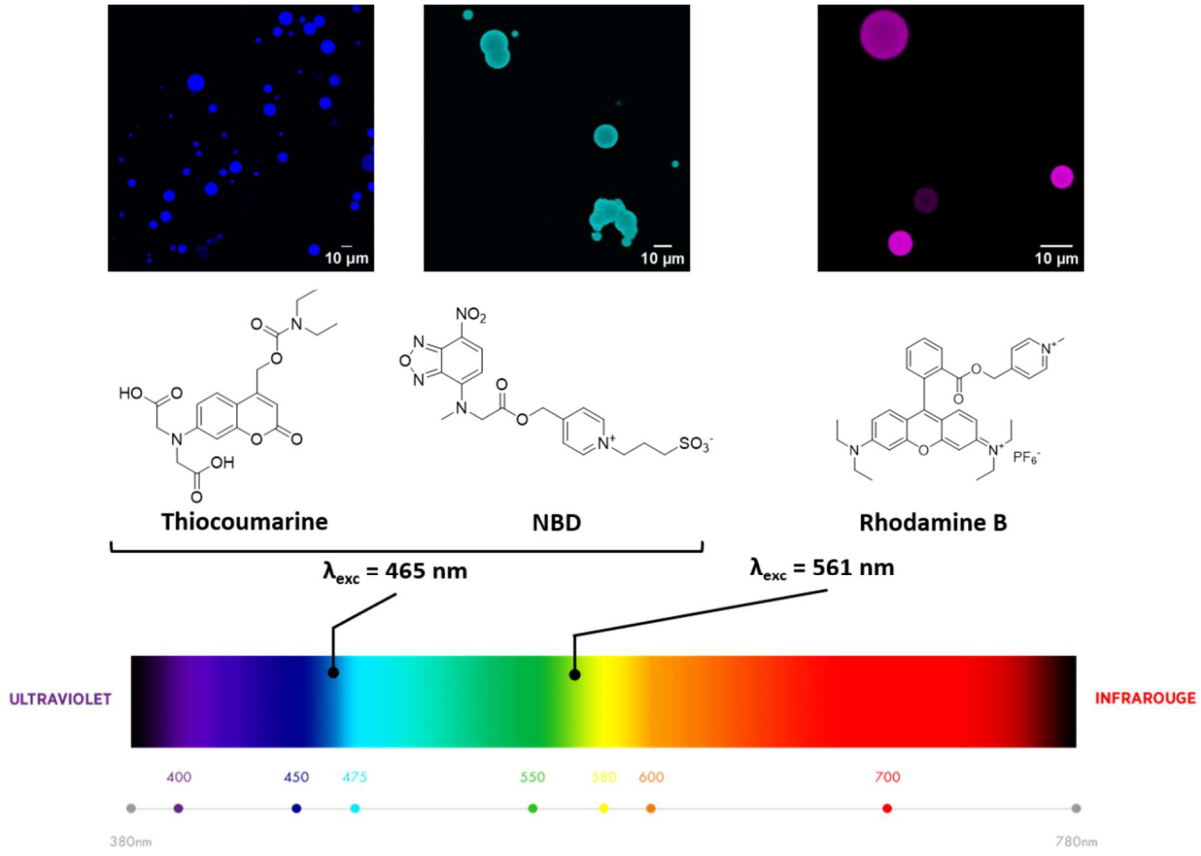


Figure 57. Encapsulation de différents fluorophores dans les polymersomes : structures chimiques, longueurs d'onde d'excitation et observations par microscopie confocale.

A l'inverse, les formulations contenant de la thiocoumarine présentaient une morphologie proche de celle des formulations de référence, avec une encapsulation homogène et reproductible (**Figure 58A**). Une caractérisation complémentaire des polymersomes chargés en thiocoumarine a été réalisée. Ceux-ci présentent un diamètre moyen de 7,32 ± 0,24 µm (n = 132 polymersomes pour 8 batches) (**Figure 58B**) avec une polydispersité de 0,24, indiquant une distribution granulométrique relativement homogène.

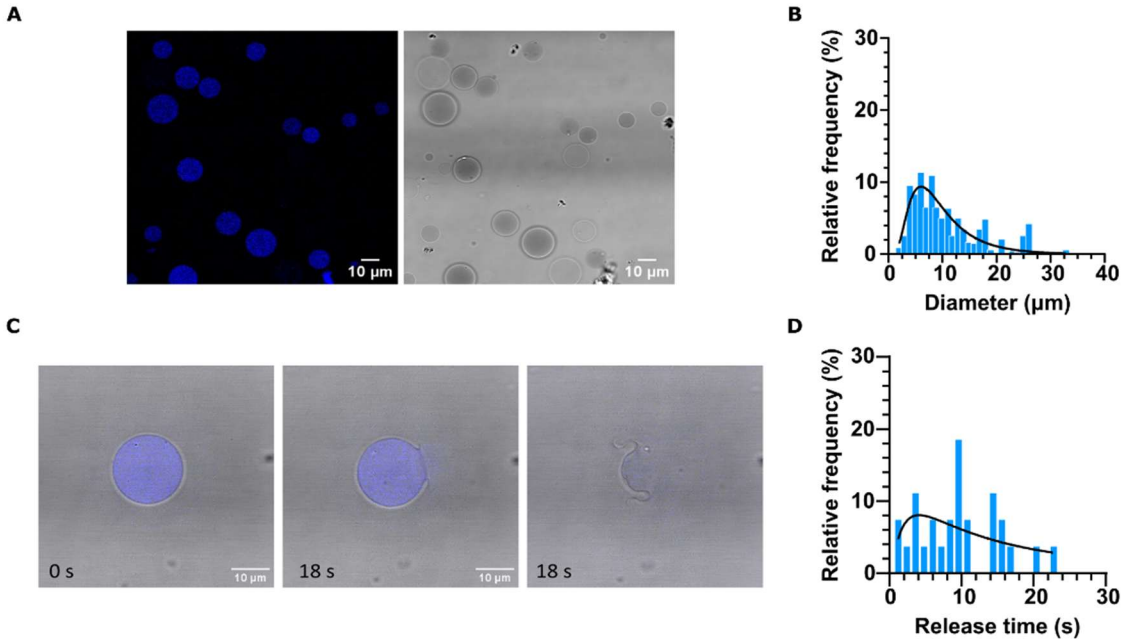


Figure 58. Caractérisation des polymersomes chargés en thiocoumarine (20 mM).
(A) Images représentatives de polymersomes chargés en thiocoumarine observés par microscopie confocale en fluorescence (gauche) et en transmission (droite). Barre d'échelle = 10 µm. **(B)** Distribution des diamètres des polymersomes chargés en thiocoumarine. La fréquence relative (%) est représentée sous forme d'un histogramme ajusté par une loi log-normale (moyenne géométrique = 8,4 µm ; écart-type géométrique = 1,8 ; R2 = 0,22). **(C)** Images confocales représentatives d'un polymersome avant et après rupture. Barre d'échelle = 10 µm. **(D)** Distribution des temps de rupture sous photostimulation. La fréquence relative (%) est représentée sous forme d'un histogramme ajusté par une loi log-normale (moyenne géométrique = 16,8 s ; écart-type géométrique = 3,3 ; R2 = 0,15).

La capacité de photostimulation des différentes formulations a ensuite été évaluée dans des conditions expérimentales identiques à celles utilisées pour le système de référence. Malgré une encapsulation efficace, attesté par la présence d'un signal fluorescent intravésiculaire, une réponse de photostimulation n'a été observée que pour une seule des formulations testées. Les formulations basées sur le NBD et la rhodamine B n'ont pas montré de rupture significative dans les conditions expérimentales utilisées. Seule la thiocoumarine a permis d'induire une rupture membranaire efficace et reproductible des polymersomes sous illumination (**Figure 58C**). La distribution des temps de rupture en solution a révélé un temps de rupture moyen de 9,41 ± 1,11 s (n = 27 polymersomes pour 5 batches) (**Figure 58D**). En raison de cette réponse fonctionnelle, la thiocoumarine a été retenue pour les premières expériences *in vivo (***5.2.1**, Cohorte C1 Formulation F1).

Ces résultats indiquent que le développement de polymersomes photoactivables repose sur deux critères complémentaires : une encapsulation efficace du fluorophore et le maintien de propriétés photochimiques suffisantes après encapsulation pour permettre une

photolibération. Outre la calcéine, la thiocoumarine est la seule molécule ayant satisfait simultanément ces deux critères dans les conditions étudiées.

1.2. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PHOTOSTIMULATION DANS UN MODELE DE TISSU CEREBRAL (*BRAIN PHANTOM*)

L'ensemble des expériences réalisées dans les *brain phantom* avait pour objectif de valider l'injection, la visualisation et la photostimulation de polymersomes photoactivables dans un environnement tridimensionnel contrôlé, plus proche du tissu cérébral que les essais en solution.

L'injection de calcéine libre a dans un premier temps permis de vérifier le bon fonctionnement du système d'injection et du dispositif d'imagerie associé. La diffusion homogène du signal dans le gel a confirmé la capacité du dispositif à délivrer et détecter un fluorophore dans ce milieu tridimensionnel.

Des polymersomes marqués à la rhodamine B au niveau de leur membrane ont ensuite été utilisés comme outil de contrôle afin d'évaluer l'intégrité des vésicules lors de l'injection par des pipettes en verre dont le diamètre a été ajusté. Ce marquage membranaire a permis de vérifier la conservation de l'organisation vésiculaire après passage dans la micropipette et au sein du gel d'agarose. L'observation par microscopie confocale a mis en évidence la présence de structures vésiculaires intactes à proximité immédiate du site d'injection (**Figure 59**), suggérant que les contraintes mécaniques associées à l'injection n'induisent pas de déformation majeure dans ces conditions expérimentales.

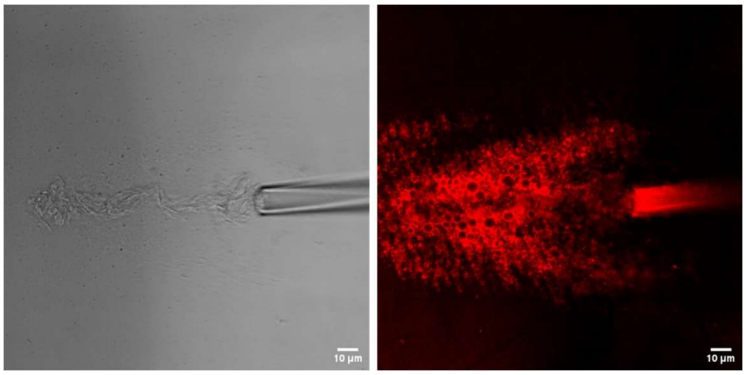


Figure 59. Images confocales de polymersomes marqués à la rhodamine B après injection dans un gel d'agarose.
Images acquises en transmission (gauche) et en fluorescence (droite). Des structures vésiculaires présentant un marquage membranaire à la rhodamine B sont observées à proximité de la pipette d'injection. Barre d'échelle = 10 µm.

Les formulations photoactivables encapsulant la calcéine ont ensuite été évaluées dans ce modèle. Les polymersomes co-encapsulant la calcéine et le CNQX n'ont pas été utilisés dans ces expériences, le *brain phantom* ne contenant aucune cible biologique permettant d'évaluer l'activité pharmacologique du CNQX après photolibération. Dans ce contexte, l'utilisation de polymersomes chargés uniquement en calcéine était suffisante pour valider le maintien des propriétés de photostimulation après injection. Après injection, les polymersomes présentaient une accumulation locale au niveau du site d'injection, mais plusieurs vésicules individuelles ont pu être sélectionnées pour des expériences de photostimulation ciblée. L'application du protocole de photostimulation a induit une rupture contrôlée des polymersomes (**Figure 60A**), associée à une augmentation transitoire de l'intensité de fluorescence au niveau de la région d'intérêt (**Figure 60B**), correspondant à la libération de la calcéine encapsulée dans le milieu environnant. Cette évolution temporelle du signal conforte le maintien des propriétés photoactivables des polymersomes après injection dans le gel d'agarose. Ces résultats indiquent que les contraintes mécaniques associées à l'injection n'altèrent pas de manière significative la réponse des polymersomes à l'illumination et témoignent d'une stabilité satisfaisante des vésicules pendant la durée des expériences.

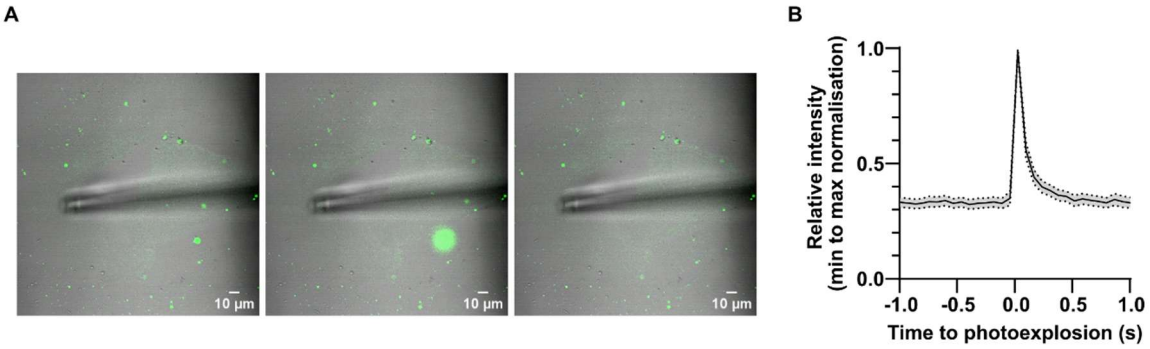


Figure 60. Photostimulation de polymersomes chargés en calcéine dans un gel d'agarose.
(A) Images confocales représentatives d'un polymersome avant (gauche), au moment de la rupture (centre) et après rupture sous illumination (droite). La photostimulation est réalisée dans une région d'intérêt (ROI) définie au microscope confocal. Barre d'échelle = 10 µm. **(B)** Evolution de l'intensité de fluorescence normalisée (min-max) en fonction du temps précédant la rupture du polymersome.

Enfin, certaines limites du dispositif ont été identifiées. L'insertion de la micropipette pouvait induire localement des zones de déformation de la matrice, dans lesquelles les polymersomes avaient tendance à s'accumuler. Par ailleurs, des événements de rupture ont

été observés à la sortie de la micropipette, suggérant une perte partielle de vésicules lors de l'étape d'injection.

Malgré ces limites, ces résultats montrent que les polymersomes conservent leurs propriétés de photostimulation dans un environnement tridimensionnel contrôlé. Le *brain phantom* constitue ainsi une étape de validation intermédiaire entre les expériences en solution et les études réalisées sur tissu cérébral, tout en permettant d'identifier plusieurs contraintes techniques susceptibles d'influencer les expériences ultérieures.

1.3. OPTIMISATION DES STRATEGIES DE DETECTION *IN VIVO*

1.3.1. F1 : Polymersomes chargés de thiocoumarine et marqués à la rhodamine B

La formulation F1 correspond à des polymersomes encapsulant de la thiocoumarine et présentant un marquage membranaire à la rhodamine B (**Figure 61**). Elle a été développée dans le cadre des premières études *in* vivo, la thiocoumarine présentant un maximum d'excitation situé autour de 465 nm, ce qui permet de préserver le canal d'imagerie à 488 nm pour les acquisitions. Le marquage membranaire à la rhodamine B (excitation à 561 nm) permet quant à lui la visualisation de la membrane des polymersomes, assurant ainsi le suivi structural des vésicules *in vivo*.

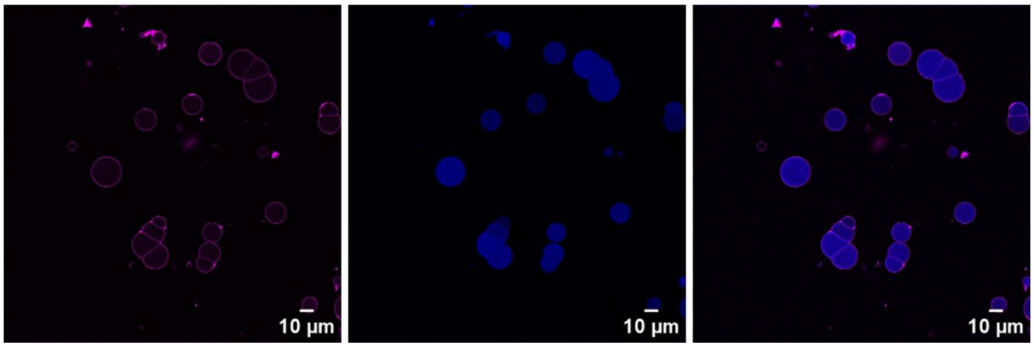


Figure 61. Images confocales de polymersomes chargés en thiocoumarine et marqués à la rhodamine B au niveau de leur membrane.
Images de fluorescence de la rhodamine B (gauche) et de la thiocoumarine (centre), ainsi que leur superposition (droite). Barre d'échelle = 10 µm.

Biodistribution des polymersomes dans le cerveau

La biodistribution des polymersomes a été évaluée après injection stéréotaxique de 2 µL de formulation F1 dans le striatum et le cortex préfrontal. Pour chaque animal, un hémisphère était injecté avec des polymersomes, tandis que l'autre était injecté avec le même

volume d'une solution véhicule. Sept cerveaux de souris ont été prélevés à J+1, J+3, J+7 et J+21 après injection (n = 1 à 2 cerveaux par temps), puis clarifiés selon le protocole avant acquisition par microscopie à fluorescence à feuille de lumière, conformément à la méthodologie décrite dans la section **DEMARCHE EXPERIMENTALE** (**Figure 62A**). L'analyse des reconstructions tridimensionnelles a révélé un signal fluorescent le striatum à J+7 mais faible voire absent à J+1, J+3 et J+21 (**Figure 62B**). De plus, une comparaison des signaux entre des hémisphères injectés et non injectés pour un même animal n'a mis en évidence aucune différence notable (**Figure 62C**). Cela suggère que le signal détecté n'est pas spécifique aux polymersomes, mais plutôt à l'injection elle-même, dont on sait qu'elle peut créer de l'autofluorescence par les micro-lésions vasculaires et la neuroinflammation locale qu'elle peut induire.

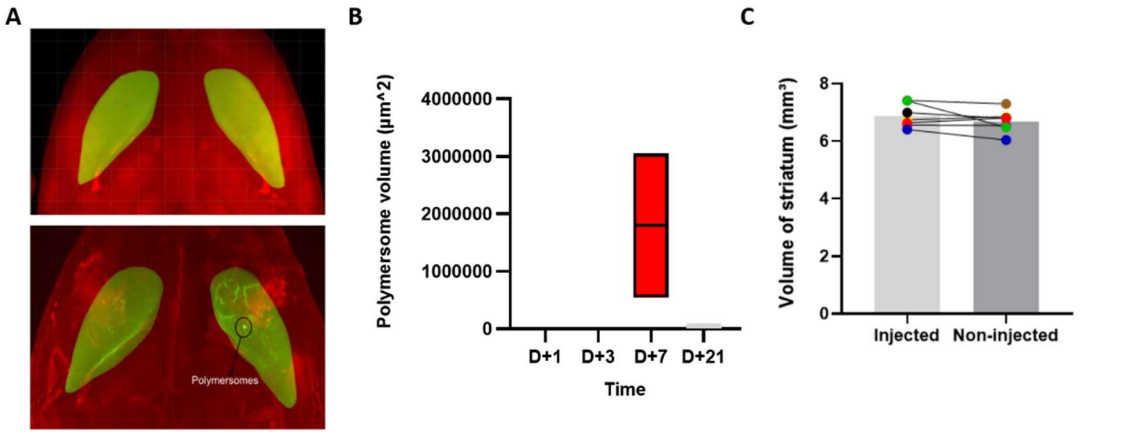


Figure 62. Distribution des polymersomes injectés dans le striatum et évaluation du volume tissulaire. **(A)** Images représentatives d'un cerveau contrôle clarifié sans injection de polymersomes (haut) et d'un cerveau injecté localement dans le striatum droit avec des polymersomes (bas). **(B)** Quantification du volume de signal associé aux polymersomes dans le striatum aux différents temps post-injection (J+1, J+3, J+7 et J+21). **(C)** Comparaison du volume du striatum injecté et du striatum controlatéral non injecté. Aucune différence significative n'est observée entre les deux conditions. (N= 7 souris, test t apparié ; t = 1,39, df = 6, p = 0,21).

Localisation cellulaire des polymersomes

La localisation cellulaire des polymersomes a été étudiée par immunofluorescence et microscopie confocale à J+1, J+3, J+7 et J+21 après injection. Les neurones ont été identifiés à l'aide du marqueur DARPP-32 (spécifique des neurones majoritaires du striatum), les microglies par IBA-1 et les astrocytes par GFAP. Les analyses de colocalisation ont été réalisées sous ImageJ et exprimées comme le pourcentage de polymersomes (signal rouge) colocalisant avec chaque type cellulaire (signal vert).

Les polymersomes ont été détectés en faible quantité dans l'ensemble des échantillons analysées. Une colocalisation avec les trois types cellulaires étudiés a néanmoins été observée. Pour les neurones marqués par DARPP-32, les taux moyens de colocalisation les plus élevés ont été mesurés à J+3 (22,38 ± 2,59 %) et J+7 (26,87 ± 5,71 %) (**Figure 63**). Concernant la microglie, la colocalisation était plus importante que pour les autres types cellulaires, avec un maximum observé à J+1 (70,85 ± 4,21 %) (**Figure 64**). La colocalisation avec les astrocytes est restée faible à l'ensemble des temps étudiés, avec notamment une valeur de 0,78 ± 0,78 % à J+21 (**Figure 65**).

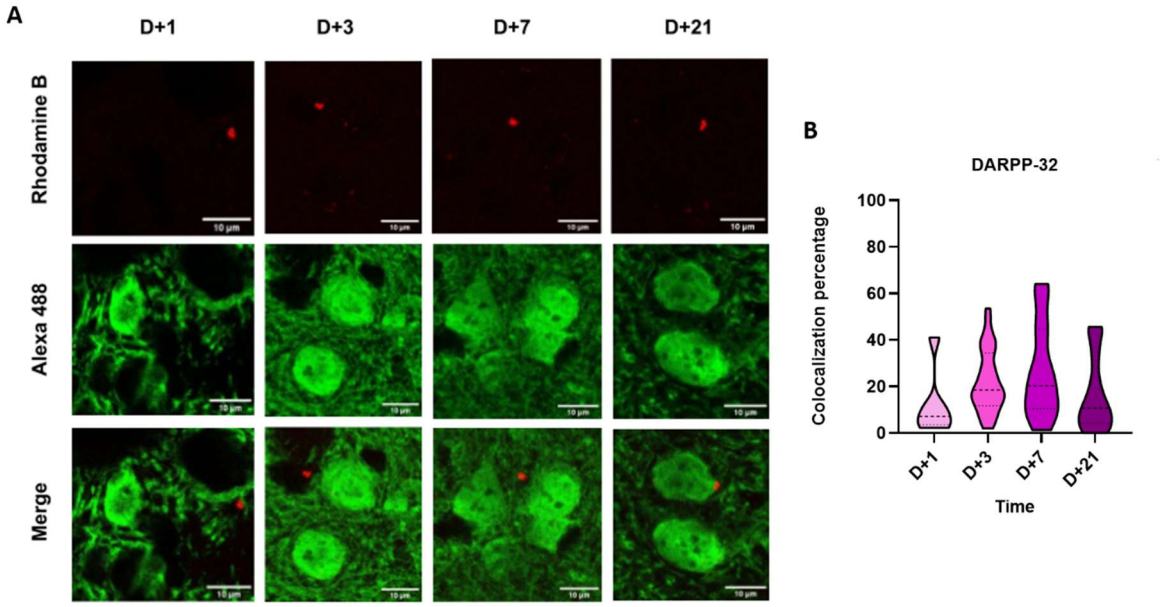


Figure 63. Analyse de la colocalisation des polymersomes marqués à la rhodamine B avec les neurones du striatum.
(A) Images représentatives de neurones immunomarqués avec le marqueur DARPP-32 (vert) et de polymersomes marqués à la rhodamine B (rouge). Barre d'échelle = 10 µm. **(B)** Quantification de la proportion de polymersomes présentant une colocalisation avec les neurones aux différents temps suivant l'injection. Aucune différence significative n'est observée entre les pourcentages de colocalisation aux différents temps post-injection (test de Kruskal-Wallis ; H(3, N = 65) = 6,75 ; p = 0,08). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM : J+1 = 12,17 ± 5,96, J+3 = 22,38 ± 2,59, J+7 = 26,87 ± 5,71, J+21 = 16,6 ± 3,66.

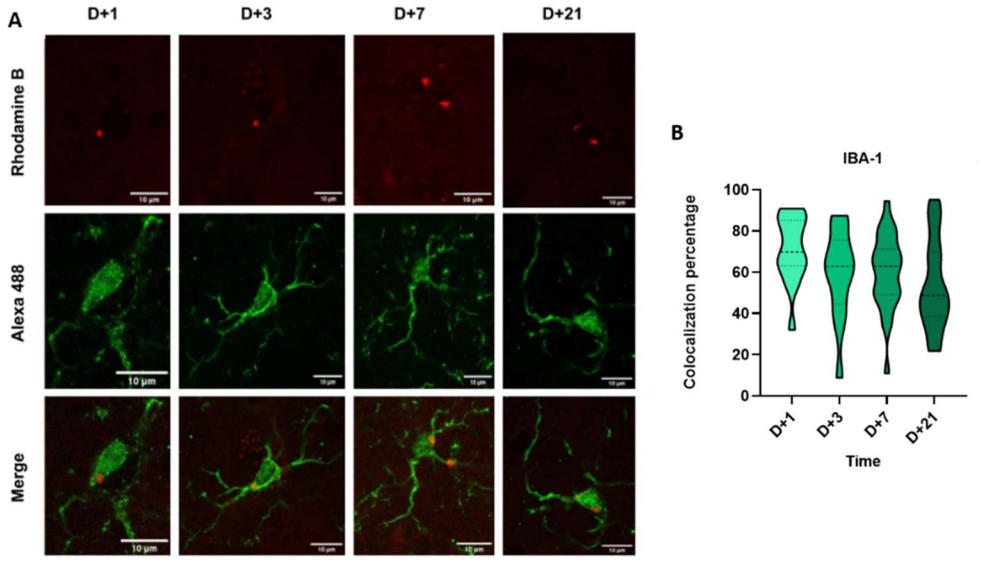


Figure 64. Analyse de la colocalisation des polymersomes marqués à la rhodamine B avec les cellules microgliales du striatum.

(A) Images représentatives de cellules microgliales immunomarqués avec le marqueur IBA-1 (vert) et de polymersomes marqués à la rhodamine B (rouge). Barre d'échelle = 10 µm. **(B)** Quantification de la proportion de polymersomes présentant une colocalisation avec les cellules microgliales aux différents temps suivant l'injection. Aucune différence significative n'est observée entre les pourcentages de colocalisation aux différents temps post-injection (ANOVA à un facteur (Temps) ; F(3,71) = 2,17, p = 0,09). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM : J+1 = 70,85 ± 4,21, J+3 = 59,18 ± 6,11, J+7 = 60,16 ± 3,48, J+21 = 53,83 ± 4,94.

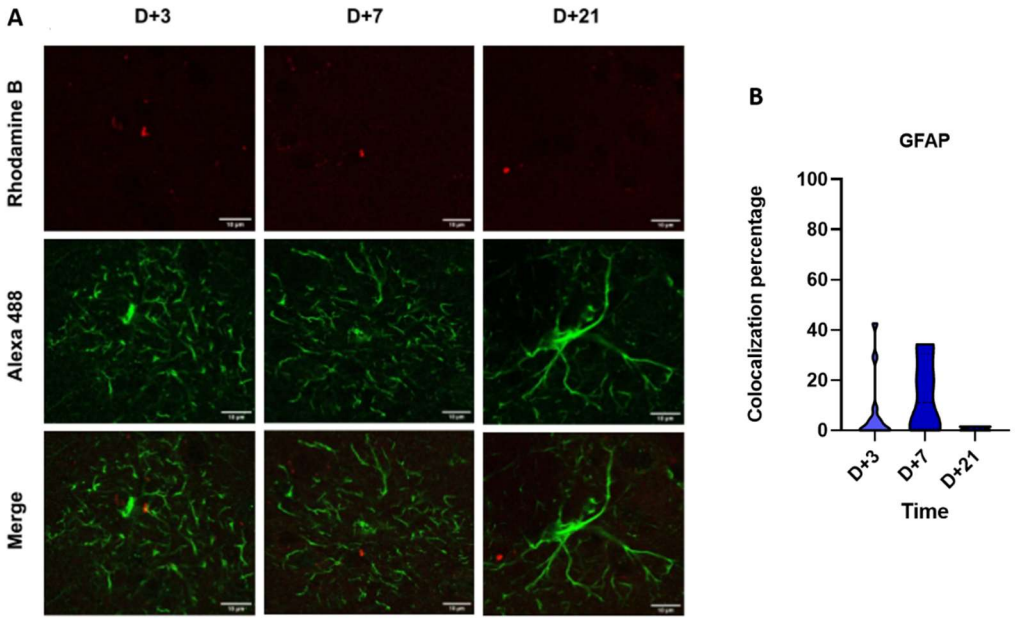


Figure 65. Analyse de la colocalisation des polymersomes marqués à la rhodamine B avec les astrocytes du striatum.

(A) Images représentatives d'astrocytes immunomarqués avec le marqueur GFAP (vert) et de polymersomes marqués à la rhodamine B (rouge). Barre d'échelle = 10 µm. **(B)** Quantification de la proportion de polymersomes présentant une colocalisation avec les astrocytes aux différents temps suivant l'injection. Aucune différence significative n'est observée entre les pourcentages de colocalisation aux différents temps post-injection (test de Kruskal-Wallis H (2, N = 19) = 1,39, p = 0,56). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM : J+3 = 7,04 ± 3,7, J+7 = 14,14 ± 7,95, J+21 = 0,78 ± 0,78.

Aucune variation significative du taux de colocalisation n'a été observée au cours du temps pour les neurones (p = 0,008), la microglie (p = 0,09) et les astrocytes (p = 0,56) (**Figure 66**). En revanche, le taux de colocalisation avec la microglie était significativement supérieur à celui observé avec les neurones et les astrocytes pour l'ensemble des temps analysés. Une diminution du taux de colocalisation après J+7 a été observée pour les trois marqueurs étudiés, sans toutefois atteindre le seuil de significativité statistique (DARPP-32 : p = 0,5, IBA-1 :p = 0,69, GFAP : p = 0,83). Ces résultats suggèrent que les polymersomes sont potentiellement internalisés par les microglies et dans une moindre mesure par les neurones, mais pas par les astrocytes. Cependant les objets fluorescents détectés sont de très petite taille et n'ont pas les propriétés morphologiques typiques des polymersomes. De plus, le manque de variation significative au cours du temps n'est pas en accord avec des études préliminaires réalisées au laboratoire. Il faudrait donc pouvoir confirmer que ces objets sont bien spécifiques des polymersomes avant de pouvoir interpréter les résultats.

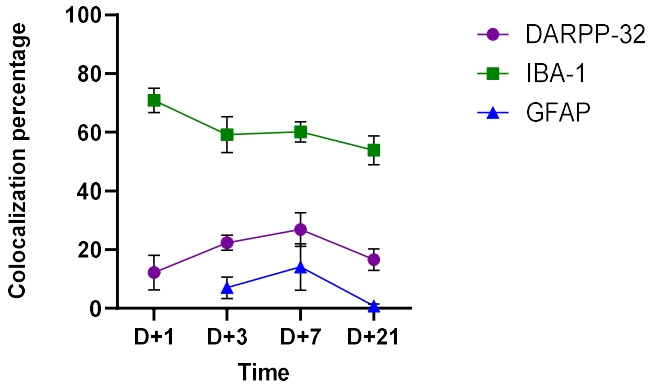


Figure 66. Comparaison de la colocalisation des polymersomes marqués à la rhodamine B avec les neurones, les microglies et les astrocytes du striatum à différents temps post-injection.
La proportion de polymersomes présentant une colocalisation avec chaque type cellulaire a été comaprée par une ANOVA à deux facteurs. Aucun effet significatif du temps n'est observé ($F(1,82 ; 59,45) = 1,42$, $p = 0,24$. L'effet du facteur « type cellulaire » était en revanche hautement significatif, $F(2, 64) = 59,69$; $p < 0,0001$). Aucune interaction significative entre le temps et le type cellulaire n'es détectée ($F(4, 65) = 0,09$; $p = 0,98$).

1.3.2. F2 : Polymersomes chargés de cyanine 5

La formulation F2 a été développée afin d'améliorer la détection des polymersomes dans des longueurs d'onde plus élevées (λ_{exc} = 646 nm). L'encapsulation de la cyanine 5 au sein des polymersomes a été évaluée par microscopie confocale (**Figure 67**).

L'observation des échantillons a révélé la présence d'un signal fluorescent localisé à l'intérieur des vésicules, confirmant l'encapsulation de la cyanine 5 dans le compartiment aqueux interne des polymersomes. Les vésicules observées présentaient des morphologies similaires avec celle des formulations précédemment développées, indiquant que l'incorporation de ce fluorophore n'altère pas la formation des polymersomes dans les conditions expérimentales utilisées.

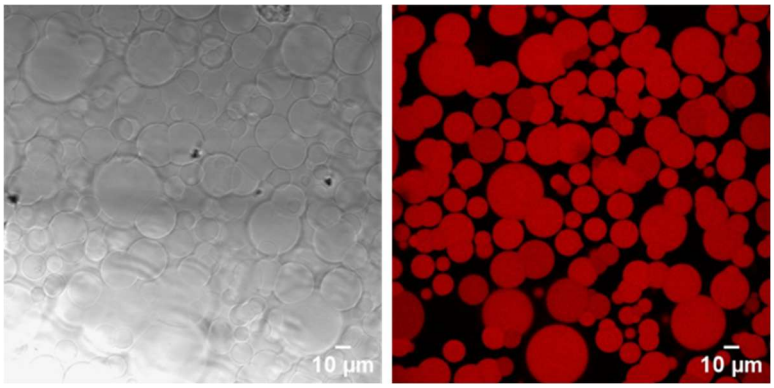


Figure 67. Images confocales de polymersomes chargés en cyanine 5.
Image en transmission (gauche) et image de fluorescence de la cyanine 5 (droite). Barre d'échelle = 10 µm.

La transparisation cérébrale a été réalisée après injection stéréotaxique de 2 µL de polymersomes F2, selon les protocoles DISCO et CUBIC, afin d'évaluer la visualisation des polymersomes dans le tissu cérébral clarifié. Les acquisitions ont été effectuées par microscopie à fluorescence à feuille de lumière. Dans les deux conditions de transparisation testées, un signal fluorescent a été observé au niveau du site d'injection, mais celui-ci était également présent dans les cerveaux contrôles injecté avec la solution de glucose (**Figure 68**). En conséquence, le signal détecté ne permettait pas de distinguer spécifiquement la présence des polymersomes. Dans ces conditions, aucune analyse de localisation ou de quantification des polymersomes n'a pu être réalisée.

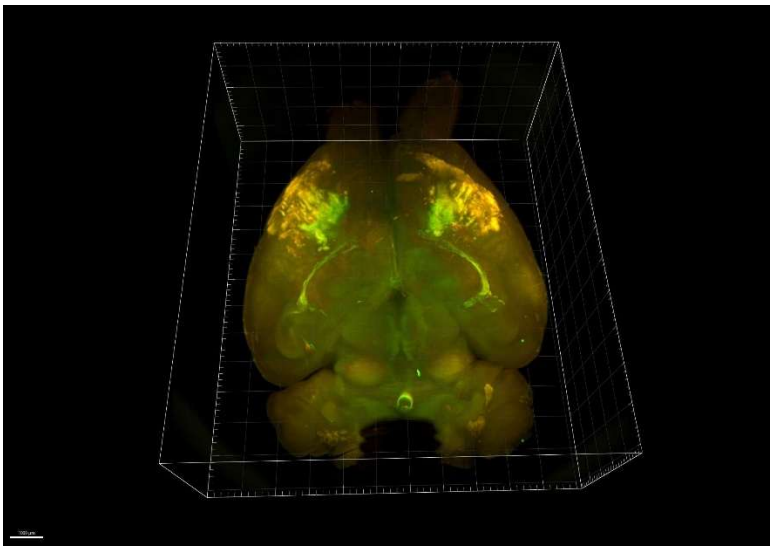


Figure 68. Exemple de reconstruction 3D d'un cerveau clarifié.
Reconstruction 3D d'un cerveau clarifié après injection stéréotaxique de polymersomes F2 (côté droit) ou de solution contrôle de glucose (côté gauche). Un signal fluorescent comaprable est observé au niveau des deux sites d'injection, indiquant que la fluorescence détectée n'est pas spécifique des polymersomes et ne permet leur identification dans le tissu cérébral.

1.3.3. F3 et F4 : Polymersomes marqués à la cyanine 5.5 (extrudés ou non)

La formulation F3 a été développé pour permettre un marquage membranaire des polymersomes par la cyanine 5.5, dans le but de faciliter leur visualisation et leur suivi structural par de l'imagerie *ex vivo* et *in vivo*. Lorsque les polymersomes étaient en solution, L'analyse par microscopie confocale a confirmé la formation de vésicules bien définies, avec un signal fluorescent localisé au niveau des membranes. L'intégrité des structures observées était comparable à celle des formulations précédentes préparées par émulsion-centrifugation, et la formation des polymersomes présentait un rendement élevé (**Figure 69**).

La formulation F4 correspond à une version de F3 soumise à une étape d'extrusion visant à réduire la taille des polymersomes. Une première extrusion à travers une membrane de 5 µm a été réalisée comme étape intermédiaire afin de valider le procédé. Les observations confocales ont confirmé la conservation du marquage membranaire à la cyanine 5.5 ainsi que la formation des vésicules de taille réduite et relativement homogène après extrusion (**Figure 69**). Une seconde extrusion a ensuite été effectuée à travers une membrane de 1 µm. A cette échelle, les polymersomes individuels devenaient difficilement observables par microscopie confocale en raison de leur faible taille et de leur mobilité accrue. Néanmoins, la présence de signaux fluorescents ponctuels a confirmé la persistance de marquage membranaire à la

cyanine 5.5 après extrusion, suggérant le maintien des structures vésiculaires dans ces conditions (**Figure 69**).

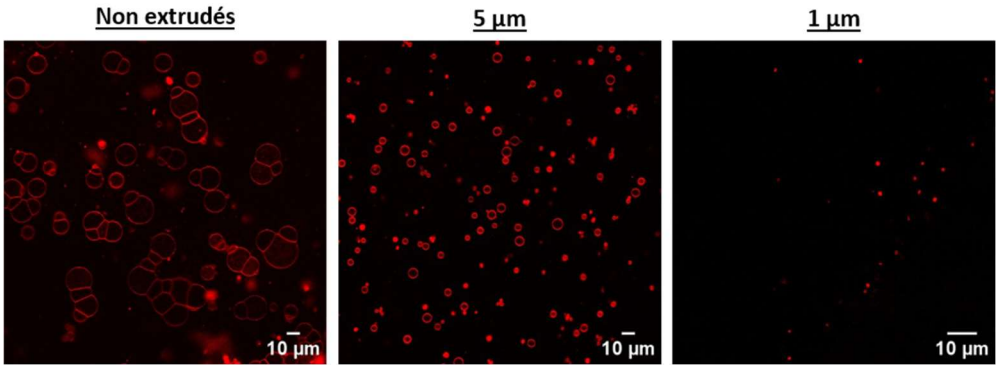


Figure 69. Images confocales des polymersomes marqués à la cyanine 5.5 au niveau de leur membrane. Formulation F3 non extrudée (gauche) et formulation F4 après extrusion à travers des membranes de 5 µm (centre) puis de 1 µm (droite).

L'objectif de cette formulation était de pouvoir suivre les polymersomes dans le cerveau au cours du temps après injection cérébrale avec des imageurs de fluorescence *in vivo* non invasifs, disponible sur la plateforme Vivoptic TBM Core. Le laboratoire avait obtenu des résultats préliminaires en 2019 et 2021, avec d'autres types de polymersomes, de taille nanométrique mais non photosensibles. Cependant, les polymersomes F3 et F4 n'étaient pas observables avec ces imageurs, possiblement du fait de la taille plus grande, et donc de la plus petite surface de fluorescence. Nous n'avons donc pas pu poursuivre ces expériences.

Finalement, il apparaît suite à ces tests que l'observation des polymersomes dans le tissu cérébral représente un véritable défi et il n'est pas encore possible de savoir si c'est dû aux outils utilisés (microscopes, protocoles de marquage ou de transparisation, etc.), ou à la non-persistance des polymersomes lors du procédé d'injection dans le cerveau.

CHAPITRE 2

2. CONTROLE SPATIOTEMPOREL DE LA DELIVRANCE MOLECULAIRE DANS LE CERVEAU A L'AIDE DE POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES

Ce chapitre correspond à un article en cours de révision et démontre l'intérêt des polymersomes photoactivables pour la libération contrôlée de composés dans le tissu nerveux. Après avoir démontré la capacité de ces vésicules à co-encapsuler un composé photosensible (la calcéine) et une molécule d'intérêt (le CNQX), à conserver leur stabilité et à induire une photolibération contrôlée en conditions expérimentales, l'objectif de cette étude était d'évaluer leur comportement dans un environnement biologique pertinent et de démontrer leur capacité à moduler une fonction neuronale après stimulation lumineuse.

Dans un premier temps, la biocompatibilité des polymersomes a été évaluée *in vitro* sur des cultures neuronales primaires par mesure de la viabilité cellulaire. Leur tolérance après administration intracérébrale a ensuite été étudiée chez la souris par l'analyse en imagerie confocale des astrocytes et des microglies, afin d'évaluer la compatibilité des polymersomes avec le tissu cérébral.

Dans un second temps, la capacité des polymersomes à assurer une délivrance fonctionnelle après photostimulation a été étudiée dans des tranches cérébrales hippocampiques murines. Le CNQX, antagoniste des récepteurs AMPA/kainate, a été utilisé comme molécule modèle pour évaluer l'impact biologique de sa libération. Des enregistrements électrophysiologiques ont permis de démontrer que les polymersomes restaient stables dans le tissu cérébral avant illumination et que la photolibération du CNQX permettait une modulation contrôlée de la transmission synaptique. Ces résultats établissent une premère preuve de concept de l'utilisation de polymersomes photoactivables pour une délivrance moléculaire contrôlée par la lumière dans le tissu cérébral. Ils démontrent la combinaison au sein d'un même système de propriétés essentielles pour une future application en neurosciences : stabilité avant activation et contrôle spatio-temporel de la libération d'une molécule active.

Spatiotemporal control of molecular delivery in the brain using photoactivable polymersomes

Authors

Camille Ruffier[1], Emmanuel Ibarboure[2], Benjamin Chauvineau[1], Noël Pairault[3], Jean-Christophe Helbling[1], Maria-Florencia Angelo[1], Rémi Kinet[4], Benjamin Dehay[4], Sébastien Marais[5], Aryan Mohanani[1], Jean-Charles Nicolas[1], Baptiste Texier[1], Zahra Sebghati Mamaghani[1], Akshay Silswal[3], Pierre Trifilieff[1], Nathan D. McClenaghan[3], Sébastien Lecommandoux[2,6,*], Clémentine Bosch-Bouju[1,*]

Affiliations

[1] Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, NutriNeuro, UMR 1286, F-33076, Bordeaux, France.

[2] Organic Polymer Chemistry laboratory (LCPO), UMR 5629, CNRS, Université de Bordeaux, Bordeaux INP, ENSMAC, Pessac, France.

[3] Institute of Molecular Sciences (ISM), UMR 5255, Université de Bordeaux, CNRS, Talence, France.

[4] Univ. Bordeaux, CNRS, IMN, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France.

[5] Bordeaux Imaging Center (BIC), UAR 3420, CNRS, Université Bordeaux, US4 INSERM, Centre Broca Nouvelle Aquitaine, Bordeaux, France.

[6] Institut Universitaire de France (IUF).

[*]Corresponding authors

Clémentine Bosch-Bouju, University of Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, NutriNeuro, UMR 1286, 146 rue Leo Saignat, F-33076, Bordeaux, France. +335 5757 9235
clementine.bosch_bouju@bordeaux-inp.fr

Sébastien Lecommandoux, Organic Polymer Chemistry laboratory (LCPO), UMR 5629, CNRS, Université de Bordeaux, Bordeaux INP, ENSMAC, Pessac, France. +335 5684 6603
sebastien.lecommandoux@bordeaux-inp.fr

Preprint server: https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-9232875/v1

Keywords: nanomedicine, brain; polymersomes, photostimulation, drug delivery

Abstract

Neurological diseases remain a leading cause of disability and mortality, in part because systemically administered therapies poorly access diseased brain regions and lack spatiotemporal control. While innovative nanotechnologies offer stable and versatile carriers for drug delivery, they do not inherently enable localized, on-demand release. In parallel, optical neurotechnologies provide precise control of brain activity but cannot deliver bioactive molecules. Here, we bridge these approaches by employing photoactivatable vesicles based on polymeric amphiphiles (polymersomes) that enable light-triggered, spatially confined release of encapsulated compounds in brain tissue. First, we assessed their biosafety with MTT quantification in primary neuronal cell cultures. Second, we confirmed its biocompatibility *in vivo* with the absence of gliosis (astrocytes and microglia) up to three weeks after mouse brain infusion. Then, through the photorelease in mouse brain slices of CNQX, a competitive AMPA/kainate receptor antagonist, we demonstrated with electrophysiological recordings the ability of polymersomes to stay stable in solid brain tissue environment, until photostimulation is triggered. Photostimulation was efficient at low power intensity (6.3 mW) and amount of CNQX photoreleased was controllable with increasing light intensities. Furthermore, we established the reservoir ability of the system, with high precision of spatiotemporal control of molecular delivery. This work establishes a platform for optically-guided chemical modulation of brain networks. Beyond applications in basic and preclinical neuroscience, this strategy opens new avenues for targeted therapies in localized brain disorders, including glioblastoma.

Significance statement

Several brain disorders are not efficiently treated, due to the very low accessibility of the drugs to the diseased brain area. To encounter these limitations, intracranial approaches, such as local drug delivery or optical neurotechnologies are developed, but they do not offer precise temporal control over delivery of bioactive molecules. Here, we employed photoactivatable vesicles that enable light-triggered release of encapsulated compounds. After confirming their biosafety *in vitro* and *in vivo*, we demonstrated with neuronal recordings the ability of photoactivable vesicles to release molecules on demand in brain slices. This work exhibits a new tool for spatially and temporally controlled drug release in brain tissue, which opens new avenues for targeted therapies in localized brain disorders, including glioblastoma.

MAIN TEXT

INTRODUCTION

Beyond electrical and optical stimulation, the use of chemically-mediated triggering to modulate brain activity represents a fundamentally distinct and largely underexplored strategy. Neurotransmitters, neuromodulators, and pharmacological agents act through endogenous molecular pathways, offering the potential to regulate neural circuits with high biochemical specificity and sustained effects that are difficult to achieve with purely physical stimulation modalities(1, 2). However, precise spatiotemporal control over the delivery of such molecules within intact brain tissue remains a major challenge, owing to rapid diffusion, systemic side effects, and the lack of minimally invasive release technologies. Developing versatile approaches that enable on-demand, localized chemical neuromodulation could therefore open new avenues for both fundamental neuroscience and targeted therapeutic intervention.

Many brain diseases remain inadequately treated because systemically administered therapies reach pathological regions only inefficiently and lack temporal control over their action(3). As a result, access to diseased brain tissue remains a central bottleneck in the development of effective neurotherapeutics(4), in spite of recent advances demonstrating promising outcomes(5, 6). Although drug delivery to the brain is severely constrained by the blood-brain barrier and the structural heterogeneity of neural tissue, recent advances in minimally invasive, locally targeted engineering approaches have created new opportunities for treating localized brain disorder(7). As such, intracranial pharmacotherapy is increasingly used to target specific brain areas more precisely. In the case of focal epilepsy, anti-epileptic drugs act by reducing the global excitability of brain networks. However, it is required only in the diseased brain area, and it can be deleterious to other brain networks. For this reason, intracranial pharmacology is a therapeutic strategy already used in humans for some diseases, including focal epilepsies and glioblastoma(8, 9). Nevertheless, intracranial pharmacotherapy also has limitations, notably that drug delivery via this approach remains passive and thus is not controllable over time or in terms of dose.

To improve drug delivery, encapsulation strategies based on synthetic carriers, such as polymersomes that are self-assembled vesicles from biocompatible block copolymers, have

been extensively developed. Polymersomes are of particular biomedical interest owing to their high stability, chemical versatility, and ability to encapsulate and efficiently transport multiple therapeutic agents with high efficiency(10, 11). Stimuli-responsive release mechanisms for polymersomes have been developed, such as pH, temperature, or light, to better control the release of bioactive molecules(12–14). For brain applications, stimuli-responsive polymersomes activated by light represent a particularly relevant approach for brain interventions. Indeed, neuroscience research has undergone major technological advances with the emergence of optical methods that enable in vivo recording and manipulation of neural activity, including optogenetics, fiber photometry, and two-photon photostimulation(15). These light-based technologies are increasingly being developed to control brain circuits for clinical use(16). However, they are primarily designed to modulate neuronal networks rather than to achieve temporally controlled delivery of therapeutic agents.

Here, we leverage recent advances in optical neurotechnology to develop an innovative therapeutic strategy based on photoactivatable polymersomes(17, 18), enabling light-triggered, localized delivery of encapsulated molecules within the brain with precise control over timing, spatial distribution, and dosage. As such, we demonstrated the photorelease of CNQX, a competitive AMPA/kainate receptor antagonist, in brain tissue, in a temporally- and spatially-controlled manner. This approach establishes new experimental paradigms for preclinical research and expands the therapeutic toolkit for treating localized brain disorders.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

Poly(butadiene)-*block*-poly(ethylene oxide) copolymers (PBD_n-*b*-PEG_p) were obtained from Polymer Source, Inc. (Montreal, Canada). The P41745-BdEO polymers used exhibited narrow polydispersity indices (Mw/Mn = 1.01) and consisted of more than 85% 1,2-addition of butadiene units. The hydrophilic fraction accounted for approximately 33%. CNQX disodium salt hydrate, toluene, sucrose, glucose, calcein, and electrophysiology reagents were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. Illustrative drawings were made with Biorender and Blender 5.1b.

METHODS

Polymersomes synthesis

Emulsion-Centrifugation. Poly(butadiene)-*block*-poly(ethylene oxide) (PBut-*b*-PEG, 33% hydrophilic fraction) polymersomes were prepared using the emulsion-centrifugation method reported by Peyret et al.(Peyret, Ibarboure, Tron, et al. 2017b). Briefly, 5 µL of 0.30 M sucrose was added to 500 µL of 3 mg/mL PBut-*b*-PEG in toluene. The solution was vigorously hand-shaken for 30 seconds to create a water-in-oil emulsion. An interface was prepared by pouring 30 µL of PBut-*b*-PEG (3 mg/mL) into toluene containing 30 µL of 0.30 M glucose and allowed to stabilize for 30 minutes. 100 µL of the above emulsion was slowly poured over the interface, and the sample was immediately centrifuged (3 min, 1500 g, ambient temperature). The resulting polymersomes were allowed to recover in the lower phase for several hours. For polymersomes loaded only with calcein, 5 µL of a 10 mM calcein solution in sucrose was used to prepare the emulsion. When polymersomes were loaded with both calcein (10 mM in sucrose) and CNQX (100 µM in sucrose), 2.5 µL of each solution was used to form the emulsion. The glucose concentration was adjusted to match the osmotic pressure (300 mOsm) of the dye and CNQX in the sucrose solution.

Polymersome counting. The polymersome solution was homogenized, and the exact volume of the preparation was measured with a P1000 pipette. Counting was performed using an epifluorescence microscope (Eclipse E400) equipped with a pE-300 light source (CoolLED). The LED power is set to 1% to avoid photo-stimulating the polymersomes. Counting was performed using a Fast Read 102 determination slide (Biosigma, BVS100), in which each cell is filled with 7 µL of the polymersome solution. The number of polymersomes is calculated as follows: (Number of polymersomes per µL = Total number of polymersomes/Number of large squares) * dilution factor * 10.

Confocal Observations. Laser scanning confocal microscopy images were acquired on an inverted Leica TCS SP5 microscope (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) equipped with an HCXPLA06x, NA 1.4 oil-immersion objective in fluorescence mode. Samples (≈20 µL) were observed on an eight-well µSlide from Ibidi (CliniSciences, 80606). The laser outputs were controlled via the Acousto-Optical Tunable filter (AOTF) and the two collection windows using the Acousto-Optical Beam Splitter (AOBS) and photomultipliers (PMT) as

follows: Calcein was excited with an argon laser at 488 nm (10 %) using a 495-555 nm window. The Helium-Neon laser at 633 nm (10 %) was also used in transmission mode. Images were collected using the microscope in sequential mode to avoid emission overlap, with a line average of 4-8 and a 512*512 pixel format. The FRAP wizard, in fly mode for faster time resolution, was used to define regions of interest (ROIs) around the selected vesicles. Processing of fluorescence confocal acquisitions was performed with FIJI (ImageJ v.1.54).

Biosafety evaluation *in vitro*

Dissection. Pups (mice P0) were euthanised by decapitation, and the brain was extracted from the skull. The hemispheres were separated, and the hippocampus and meninges were removed. Cortex was cut into small pieces and incubated in papain solution (0.4 mg/mL) for 15 min at 37 °C. DNAse was added and incubated for 5 min at 37 °C. The enzymatic reaction was inactivated with an equal volume of Hibernate supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, F9665). Final dissociation was performed by mechanically pipetting the tissue with a P1000 pipette. Cells were counted with a Luna automated Cell Counter (Logos Biosystems).

Primary cell culture. Plates were incubated with coating solution containing Poly-L-Lysine (1 mg/mL) (Sigma, P2636-1G) and Laminin (3 µg/mL) (Sigma, L2020) for at least 2 h at 37 °C. All culture media were equilibrated beforehand for at least 4 h at 37 °C. Cells were seeded in seeding medium (Neurobasal-A (ThermoFischer, 12349015) supplemented with B27 plus (ThermoFisher, A3582801) and 10% FBS at 50k per well in a 96-well plate. The medium was fully replaced 1 h post-seeding to remove debris with maintenance medium (Neurobasal-A supplemented with B27 plus and 1.5% of FBS). Culture was maintained every 3-4 days by replacing half of the medium with maintenance medium, until day 14.

Biosafety evaluation in primary cell culture. Cell viability was assessed using the MTT assay (Thermofisher, V13154), with P0 mice used to obtain a cell suspension from the cortex. Cells were seeded at 50k per well in 96-well plates and incubated for 14 days at 37 °C, 5% CO_2. At maturity of the culture, two biosafety valuations were conducted, the polymersomes concentrations, respectively, 0, 600, 1500, 3000, 6000, 9000 per well and light power (0.003, 3.5, 8.7, 19.3, 30 mw), then incubated for 48 h. Half of the conditions were photo-stimulated

at 3.5 mw for 20 s using a 400 □m optical fiber with a numerical aperture of 0.5 (ThorLabs, M98L01) to assess the toxicity of polymersomes post-stimulation. Post-incubation medium was fully changed with fresh medium, and MTT reagent (10 µL, final concentration 0.5 mg/mL) was added to each well and incubated at 37 °C, inducing the formation of formazan crystals. SDS-HCl (100 µL, final concentration 50 mg/mL) was added to each well to solubilize formazan, and the mixture was incubated for 10 h at 37 °C. Absorbance was measured at 570 nm in a microplate reader. All conditions were tested in triplicate.

Biosafety evaluation *in vivo*

Animals. Adult male and female C57BL/6J mice were obtained from Janvier Labs (France). All procedures were carried out in accordance with the European Communities Council Directive 2010/63/EU and approved by the French National Committee for animal experimentation (authorization APAFIS #20925 and #50835). Mice were housed under standard laboratory conditions in a temperature- and relative humidity-controlled environment and a 12-hour light/dark cycle (lights on at 07:00). Animals were group-housed, and food and water were provided ad libitum.

Stereotactic Injections. Stereotaxic injections were performed in adult male and female mice under isoflurane deep anaesthesia. Animals were placed in a stereotaxic apparatus and maintained at 37 °C using a heating pad. A craniotomy was performed above the target region. The polymersomes were injected using a Hamilton syringe with a 34G blunt needle, connected to a nanoliter injector (World Precision Instruments, Nanofil) at a flow rate of 0.5 µL/min. Injections were performed into the CA1 region of the hippocampus, following stereotaxic coordinates relative to bregma: AP = –2.0 mm, ML = ±1.3 mm, DV = –1.2 mm. A volume of 2 µL of calcein-free polymersomes was injected per site. The pipette was left in place for 5 minutes after injection to minimise reflux. After surgery, the animals were monitored daily for 3 days to ensure their recovery.

Tissue collection and immunofluorescence. Animals were injected with buprenorphine (0.1 mg/kg, s.c.) (Virbac) and deeply anesthetized with Euthasol (400 mg pentobarbital/kg, ip) (Dechra) 30 min later. Animals were transcardially perfused with phosphate-buffered saline (PBS), followed by 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich). Brains were extracted, post-

fixed in 4% PFA at 4 °C for 48 h, and subsequently transferred to a 30% sucrose solution at 4 °C for cryoprotection. Coronal brain sections (40 µm thick) were obtained using a vibratome (Leica) and stored at −20 °C in a cryoprotective solution composed of 20% glycerol and 30% ethylene glycol (Sigma-Aldrich) in PBS.

For immunofluorescence, brain slices containing the injected zone were washed 3 times in PBS (EuroMedex, ET330), then incubated in blocking solution (10% donkey serum, 0.5 % Triton X100) before incubation overnight in blocking solution containing the primary antibody (GFAP: DAKO Z033429-2 1/1000; IBA1: Fujifilm 019-19741, 1/500). The next day, slices were washed 4 times in PBS, then incubated in blocking solution containing a secondary antibody (Donkey anti-rabbit-Alexa 488, Abcam) for 2 hours. After 3 washes in PBS, slices were mounted on glass slides, dried, and finally mounted with medium DAPI Fluoromount G (EuroMedex, EM17984-24) and coverslipped. Observations and photos were made with a widefield fluorescent microscope (DM5000, Leica, Bordeaux Imaging Center). Photos were analysed with FIJI (ImageJ v.1.54). The area of interest around the injection site was manually defined, a threshold was applied, and particles were detected automatically. The mean intensity of particles, weighted by the size of each particle, was measured for each image. For each animal, 3-5 images were analysed.

***Ex vivo* experiments**

Electrophysiological Recordings.

Hippocampal slice preparation. Mice were anaesthetized with isoflurane, then decapitated, and the brain was quickly extracted from the skull. Coronal hippocampal slices with a 5° angle (350 µm thick) were prepared using a vibrating blade microtome (VT1000S, Leica Microsystems) in ice-cold, cutting high-sucrose artificial cerebral spinal fluid (HS-ACSF) solution containing (in mM): 125 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 25 glucose, 2.5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 1.25 NaH_2PO_4, 3 pyruvate, and 75 sucrose, continuously oxygenated with 95% O_2/5% CO_2. Slices were incubated at 34 °C for 1 h, then maintained at room temperature. Recordings were initiated after at least 1 h of recovery. Recording ACSF (used for both storage and recording) contained (in mM): 125 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 25 glucose, 2.5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, and 1.25 NaH_2PO_4, and was continuously bubbled with 95 % O_2 / 5 % CO_2. All ACSF components were purchased from Sigma-Aldrich.

Electrophysiological recordings. Recordings were performed at **30 °C** using a temperature-controlled system (Warner Instruments, TC-324B). Hippocampal slices were continuously superfused with oxygenated ACSF at a rate of 3–4 mL/min using a peristaltic pump (Gilson, Minipulse 3). Patch pipettes (4–6 MΩ), pulled from borosilicate glass capillaries (Sutter Instruments, GBF-150-117-10) with a horizontal puller (Sutter Instruments, P-97), were used for intracellular recordings.

For extracellular recordings, borosilicate glass pipettes filled with ACSF were placed in the stratum radiatum of the CA1 region to record field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs). Synaptic responses were evoked by stimulation of Schaffer collateral afferents from the CA3 region using a bipolar concentric electrode (Phymep) connected to a stimulator (World Precision Instruments, A365).

Polymersomes were injected directly into the slice using borosilicate glass pipettes. Photostimulation of polymersomes was performed under an upright fluorescence microscope (Nikon FN1) equipped with a 40× water-immersion objective. Fluorescence signal was detected using a pE-300 light source (CoolLED) and a CCD camera (INFINITY 3S-1UR M/C).

Data acquisition and analysis. Signals were amplified using a MultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices) and digitized via a Digidata 1440B interface (Molecular Devices), controlled by pClamp 10.7 software. Data were analysed offline using Clampfit 11.2 (Molecular Devices).

Statistical analysis. For all data generated, statistical analyses were performed using GraphPad Prism 10 or 11. Normality was assessed using the Anderson–Darling, D'Agostino–Pearson, Shapiro–Wilk, and Kolmogorov–Smirnov tests. Depending on the data structure, comparisons were made using t-tests (paired or unpaired, parametric or nonparametric), one-way or two-way ANOVA, with appropriate post hoc tests. All tests were two-tailed, and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

1. Design of photoactivable and biocompatible polymersomes

Based on initial work(17), we formulated stable and photocleavable polymersomes using an emulsion-centrifugation method (**Fig. S1A-B**). Briefly, sucrose-containing water

droplets generated by emulsion and stabilized by a copolymer in toluene were deposited onto a glucose solution-toluene interface containing the same copolymer. Upon centrifugation, the droplets crossed the interface to form polymersomes in the glucose phase, enabling quantitative encapsulation of the molecules of interest dissolved in the sucrose phase. Here, the formulation of photoactivable polymersomes was optimised to become fully compatible with brain applications: polymersomes were obtained by self-assembly of the amphiphilic block copolymer, poly(butadiene)-b-poly(ethylene oxide) (PButn-b-PEGp), loaded with calcein (10 mM) in a medium with an osmolarity of 300 mOsm (**Fig. 1A**). Counting polymersomes with a counting grid under a fluorescent microscope (**Fig. S1C**) revealed a concentration of 267 ± 6.7 polymersomes / µl (**Fig. 1B**). Furthermore, polymersomes have a median diameter of 8.27 ± 0.14 µm (n = 1265 polymersomes for 6 batches) with a polydispersity of 0.36, indicating a rather homogeneous size distribution. (**Fig. 1C**).

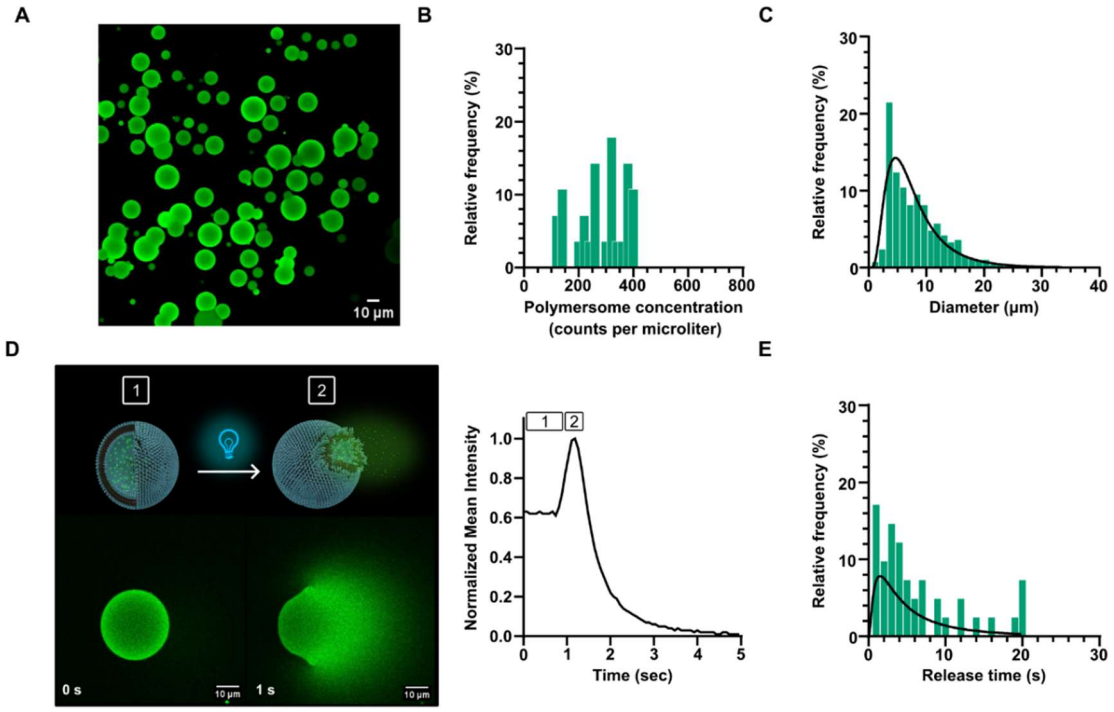


Figure 1. Confocal imaging and quantitative characterisation of photoactivable polymersomes.
(A) Confocal image of photoactivable polymersomes in the green channel ($\lambda_{exc.}$ = 488 nm). Scale bar, 10 µm. **(B)** Relative frequency (%) of photoactivable polymersomes concentration (counts per µL). **(C)** Relative frequency (%) of photoactivable polymersomes diameter (µm) displayed as a histogram with a log-normal fit (geometric mean 6.7 µm, geometric s.d. 1.8; R^2 = 0.68). **(D)** Confocal images before (1) and after photoactivable polymersomes rupture (2) in the green channel, with corresponding 3D renderings of the polymersomes displayed above the images. Scale bar, 10 µm. **(E)** Relative frequency (%) of photoactivable polymersomes release time displayed as a histogram with a log-normal fit (geometric mean 4.3 s, geometric s.d. 2.8; R^2 = 0.25).

Calcein is a water-soluble dye that undergoes photolysis within polymersomes upon illumination at 488 nm, a wavelength routinely used in neuroscience, thereby increasing the internal osmolarity. The resulting rapid rise in osmotic pressure generates membrane tension, leading to rapid, irreversible rupture, observed as an explosive disruption within seconds of irradiation (**Figure 1D**). As shown in **Figure 1D-E**, illumination of polymersomes loaded with 10 mM calcein led to the rapid rupture of the polymersome membrane and release of their contents (**videos S1, 2, 3**). Distribution of rupture times showed a mean rupture time of 6.39 ± 0.9 s (n = 41 polymersomes for 6 batches) under these irradiation conditions (**Fig. 1E, Fig. S1D**). Furthermore, no morphological changes of polymersomes were observed in calcein-free polymersomes upon illumination at 488 nm, confirming the specificity of light-induced membrane rupture. Finally, when several regions of interest (ROIs) were defined, only the selected polymersomes ruptured upon illumination (**Fig. S1E**). This approach thus enables rapid and localised release of the polymersome content, both in time and space.

2. Biosafety of photoactivable polymersomes for brain cells and tissue

After confirming that the emulsion-centrifugation process was an appropriate method for obtaining a high yield of photoactivable polymersomes with rapid, localised release of their contents, we tested their biosafety. Biosafety of both polymersomes and photorelease process were evaluated in primary cell cultures from mouse cortices and in mouse brains. First, the effect of light stimulation alone was tested, as previous studies reported deleterious effect of 470 nm light on neuronal communication(19). In our conditions, illumination of primary neuronal cell cultures with 470 nm light delivered through an optical fiber (Ø 400 µm, NA 0.5, 20 s) did not alter cell viability (**Fig. 2A, Table S1**). Next, we evaluated the impact of calcein-loaded polymersome incubation with increasing concentrations (600 to 9000 polymersomes/well) on primary neuronal cell cultures. We found no deleterious effect on cell viability (**Fig. 2B, Table S1**). Finally, we combined polymersome incubation with light illumination, at power levels that are sufficient to induce rapid photorelease (8 % of maximal power level, see Table S2 for correspondence with light intensities) and similarly, no cytotoxic effect was observed (**Fig. 2B, Table S1**). As a positive control, treatment of cells with DMSO 1% v/v and 5% v/v induces moderate and strong cell mortality, respectively (**Fig. 2B, Table S1**).

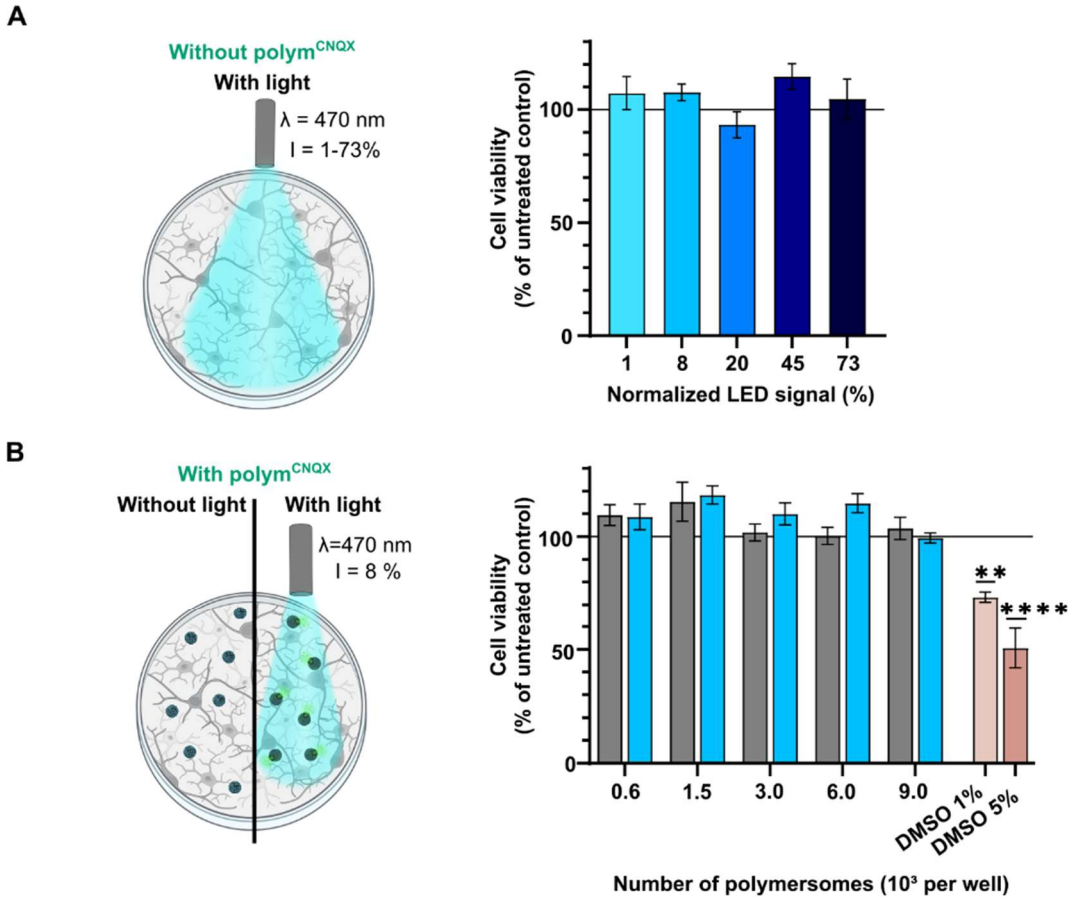


Figure 2. No cytotoxic effect of CNQX-loaded photoactivable polymersomes (600 to 9000 polymersomes/well) before and after illumination of primary cells.
(A) Primary cortical cells from P0 C57BL/6 mouse cortex (100 µL, Neurobasal-A) were illuminated at 470 nm for 20 s with intensities ranging from 1% to 73%. Cell viability was measured using the Vybrant MTT assay (Thermo Fisher) and absorbance at 570 nm. Data are mean ± SEM (n =3 wells, 3 independent experiments). No significant difference was detected versus non-illuminated controls (one-way ANOVA, $P > 0.05$). **(B)** Cells from the same suspension were incubated for 48 h with photoactivable polymersomes loaded with CNQX ($0.6\text{-}9.0 \times 10^3$ per well) or DMSO (1% or 5%) as positive controls. Viability was assessed as in a. Data are mean ± SEM (n =3 wells, 3 independent experiments). One-way ANOVA: $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.0001$ vs. untreated.

Finally, the biosafety of polymersomes was validated *in vivo*, by injecting empty polymersomes in mouse brains and assessing glial reactivity through immunostaining of IBA-1 (for microglia) and GFAP (for astrocytes) proteins at 48 h and 3 weeks after injection (**Fig. 3**). At 48 h after injection, the injected hemisphere displayed a slight but significant increased signal for IBA1 and GFAP (**Fig. 3A,B, Table S1**). However, this increase was not different between mice injected with polymersomes and those injected with vehicle solution without polymersomes (medium). This suggests that polymersomes did not induce any glial reaction beyond the stereotaxic injection itself. At 3 weeks after injection, quantification revealed no

difference in IBA1 signal between the injected and non-injected hemispheres for both polymersome and medium groups (**Fig. 3A,C, Table S1**). By contrast, the GFAP signal remained significantly higher in the injected hemisphere than in the non-injected one, but did not differ between the medium and polymersomes groups (**Fig. 3A,C, Table S1**). This indicates that polymersomes themselves have no significant short- or long-term impact on gliosis.

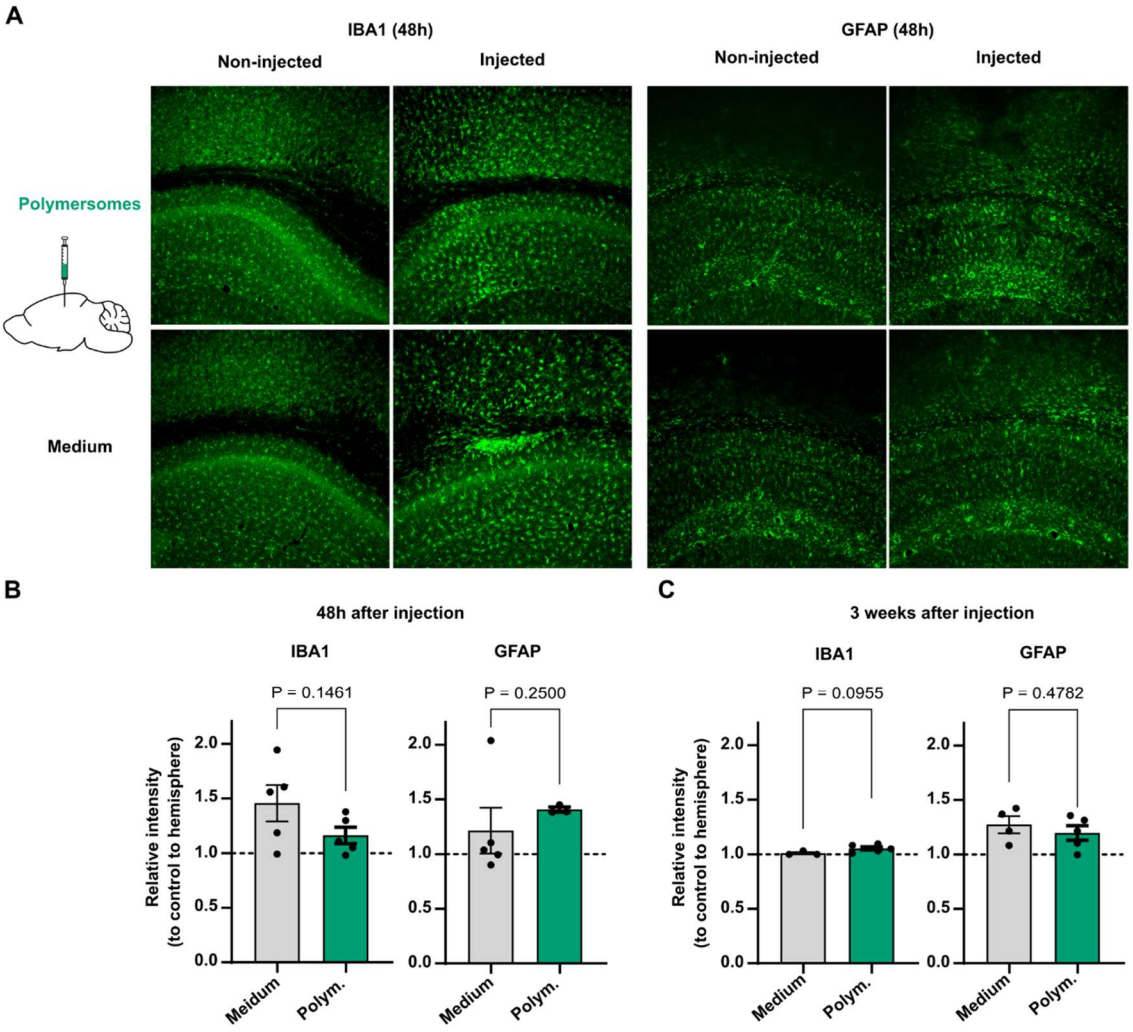


Figure 3. Microglial and astrocytic reactivity after intracranial injection of polymersomes.
(A) Representative IBA1 and GFAP immunofluorescence images at 48 h comparing injected vs non-injected hemispheres for polymersomes and control (medium) conditions. **(B-C)** Quantification of IBA1 and GFAP signal intensity in the injected hemisphere relative to the contralateral control at 48 h (b) and 3 weeks (c); dots represent individual animals and bars show mean ± SEM, with p values indicated.

Altogether, these findings demonstrate that both polymersomes and calcein-mediated photorelease are well tolerated by brain cells and brain tissue.

3. Photostimulation of polymersomes in brain slices

To demonstrate the efficacy of photorelease in brain tissue and quantify its ability to modulate neural processes, we developed an experimental paradigm based on measuring electrical synaptic transmission between connected neurons. Electrophysiological recordings were performed in mouse brain slices containing the synaptic connections between the CA3 and CA1 regions of the hippocampus, a key brain region involved in memory processes. Communication between these two structures relies on presynaptic glutamate release, which activates postsynaptic AMPA receptors and thereby enables the propagation of electrical signals from one neuron to the next. Therefore, blocking AMPA receptors with a competitive AMPA receptor antagonist, such as the well-established CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione), inhibits the electrical communication between the CA3 and CA1 regions, which can be recorded with field recordings (**Fig. 4A**). For this reason, we chose to encapsulate CNQX (100 µM) in calcein-loaded polymersomes to quantify the effect of photorelease from polymersomes on neuronal activity.

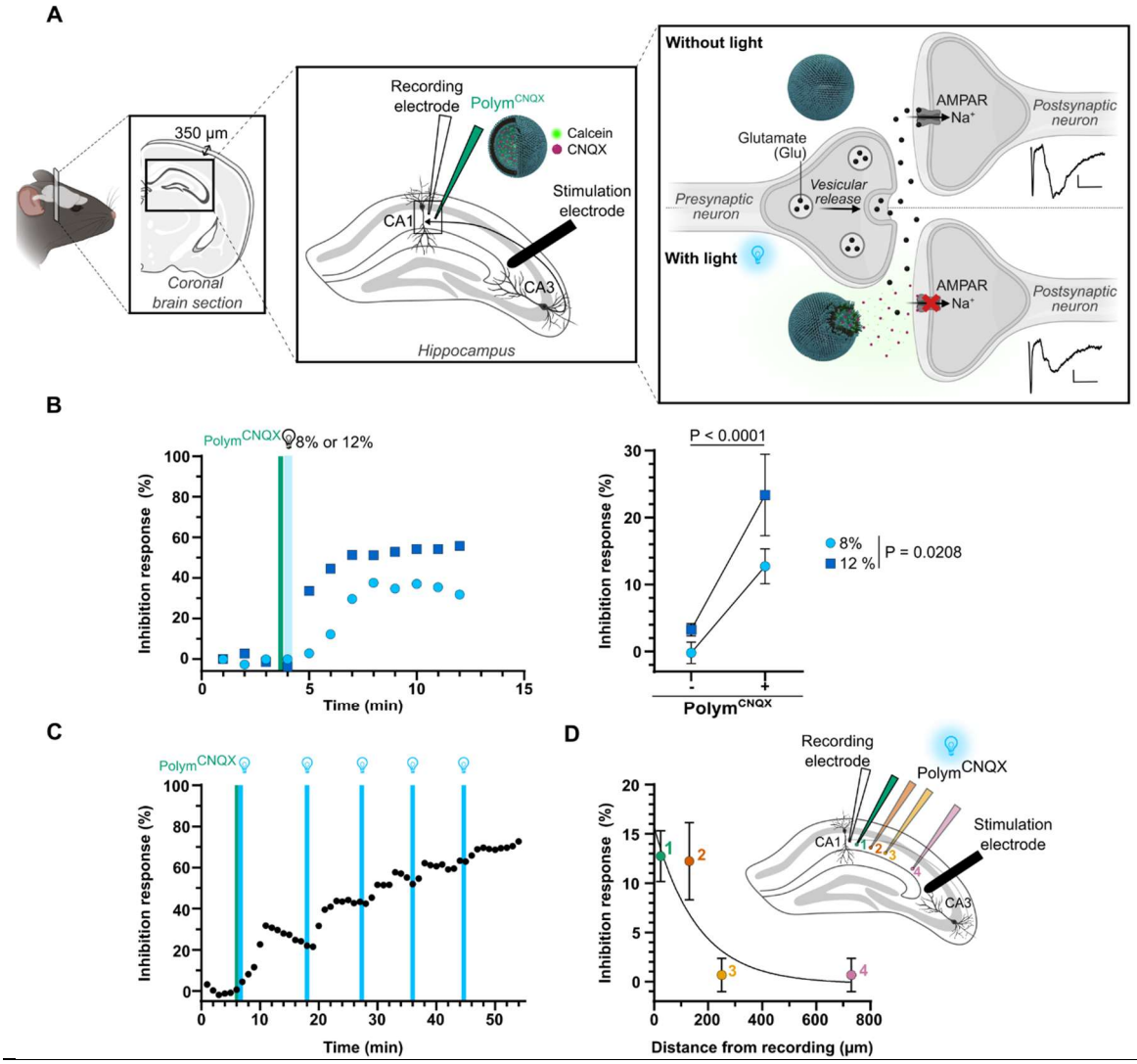


Figure 4. Spatial and temporal effect of CNQX photorelease on in vivo synaptic transmission at CA3-CA1 hippocampal.

(A) Brain slices containing CA3-CA1 connections were freshly made from adult mice. The stimulation electrode was placed in the CA3 region, and the recording field electrode was placed in the CA1 region. CNQX-containing polymersomes (polym^{CNQX}) were delivered close to the recording site with a glass pipette. Illumination (20 s) was delivered through the microscope objective. The expected effect is a reduction in field-recorded synaptic responses due to photorelease of CNQX, which blocks glutamate AMPA receptors (AMPARs). Scale bar: 10 ms, 0.5 mV. **(B)** (Left) Representative inhibition response of two recordings with CNQX photorelease performed with 8% (light blue) or 12% (dark blue) of maximal LED intensities. Injection of polymersomes in the slice (green line) was performed just before illumination (blue line). (Right) Average inhibition response of field recordings following 8% (light blue) or 12% (dark blue) illumination with or without CNQX-containing polymersomes in brain slices. Data are represented as mean ± SEM. n = 4 to 31 trials recorded from 3 to 6 slices. Two-way ANOVA: * P < 0.05, **** P < 0.0001. **(C)** Inhibition of response (%) as a function of time (min) after injection of photoactivable polymersomes loaded with CNQX (black line), followed by six illuminations at 7-min intervals of the brain slice by the microscope LED (blue line). **(D)** Inhibition of response (%) as a function of distance from recording (µm). Measurements were performed at four distances (d1 = 25 µm, d2 = 130 µm, d3 = 250 µm, d4 = 730 µm) and fitted with a single-phase exponential decay.

We first verified that encapsulation of CNQX did not alter the photostimulation properties of polymersomes (**Fig. S2**). The encapsulation of CNQX slightly, but significantly, reduced the diameter of the polymersomes (7.62 ± 0.2 µm with CNQX (n = 386 polymersomes for 7

batches) vs. 8.27 ± 0.1 µm without CNQX (n = 1265 polymersomes for 6 batches), unpaired Mann-Whitney test, $p < 0.0001$) (**Fig. S2A-C**). Moreover, the presence of CNQX in polymersomes did not change the rupture delay of polymersomes upon photostimulation (8.12 ± 0.9 s vs. 6.39 ± 0.9 s without CNQX, (n = 52 and polymersomes for 3 and 6 batches, respectively, unpaired Mann-Whitney test, $p = 0.1192$), (**Fig. S2D**). This confirms that photostimulation was not affected by the presence of CNQX within the polymersomes and suggests that polymersomes represent a versatile platform for the encapsulation of bioactive molecules.

Then, we used calcein/CNQX-loaded polymersomes to perform the photorelease of CNQX on brain slices (**Fig. 4A**). Electrical stimulation of the CA3 region induces synaptic evoked responses in CA1 region that were recorded extracellularly as field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) (**Fig. 4A, Fig. S3A**). As for cell culture, the effect of light alone on fEPSPs with increasing light intensities was first quantified (**Fig. S3B**). The power levels used were similar to those used for cell culture illumination (**Tables S2 and S3** for conversion). Under 12 % of light power, no effect was observed on fEPSP response (**Fig. S3B-C**). However, we observed a significant inhibition of fEPSP response for light powers over 14 % with a sigmoid effect (**Fig. S3B**). This is in accordance with previous studies showing that light itself can modify neuronal excitability(19). Given these results, we then used photostimulation at no more than 12% of maximal light power.

Calcein/CNQX-loaded polymersomes were applied to the brain slice near the recording site without altering the fEPSP response (**Fig. S3A,D**). This is a supplementary confirmation of the innocuity of polymersomes for brain tissue. Then, light at 8 % was delivered for 20 s. Shortly after, significant reduction of fEPSP was observed (**Fig. 4B, Fig. S3E**). A similar experiment was conducted with illumination at 12 % of the maximal power level. A stronger effect was produced (**Fig. 4B**). Of note, light stimulation applied to polymersomes containing calcein alone induced only an 5.5 % reduction of fEPSP response (**Fig. S3F**). These control experiments confirmed that the reduction in fEPSPs after polymersome photostimulation was specific to CNQX photorelease. Moreover, these results demonstrate that CNQX remains stable and bioactive following encapsulation and photorelease, further supporting the versatility of photoactivable polymersomes for drug delivery.

Spatial and temporal precision of CNQX delivery

To further define the spatiotemporal range of action of photoactivatable polymersomes in brain applications, the precision of CNQX photorelease was investigated in acute brain slices. First, we compared photostimulation to whole bath application of CNQX (**Fig. S4**). On one side, we confirmed that bath application of CNQX at 10 µM almost annihilates fEPSP response (76.5 ± 8.2% of inhibition of fEPSP baseline) while 0.5 µM of CNQX in the bath induced a minimal inhibition of fEPSP (7.61 ± 4.40 % of inhibition of fEPSP baseline) (**Fig. S4A,B**). On the other hand, photostimulation of polymersomes containing CNQX at 100 µM induced on average a 12 % inhibition of fEPSP response as shown in **Figure 4B**, which equates to ~0.8 µM of CNQX bath application (**Fig. S4B**). This indicates that only a limited number of polymersomes were locally activated, consistent with the intended spatial confinement of photorelease. Furthermore, repeated illumination after a single polymersome injection triggered successive CNQX release events (**Fig. 4C, Table S1**), in accordance with the fact that not all polymersomes undergo lysis with the first illumination (**Video S3**). Together, these results support localized photorelease and establish polymersomes as highly potent on-demand reservoirs for sustained, spatially restricted drug delivery.

Finally, the spatial resolution of the photostimulation was further investigated with photostimulation spots that are distant from the recording pipette (**Fig. 4D, Fig. S4C-E**). Reduction of fEPSP amplitude upon CNQX photorelease was evident for short distances (<200 µm) and subside over 200 µm. Remarkably, a distance-dependent gradient was observed, as shown with the non-linear fit of the data (**Fig. 4D**).

These results confirmed that the photorelease of polymersomes enables local action within a diameter of less than 200 µm.

DISCUSSION

In this study, we introduced a unique strategy for the precise, light-controlled release of bioactive compounds within brain tissue based on photoactivatable polymersomes. Our findings establish polymersomes as robust vectors for targeted delivery to the central nervous system, combining biocompatibility, stability, and versatile encapsulation capabilities(20). Future developments will extend this platform to deliver more complex cargos—including large or hydrophobic molecules and biologics such as enzymes — an objective supported by

recent advances in polymer engineering, including a double-encapsulation strategy(21–23). Indeed, because stimulated release from photoactive polymersomes is independent of the bioactive species itself, this approach is expected to be amenable to a range of molecules, biologics, and cocktails of active species.

Equally, because light can be applied in a highly localized manner with easily controlled intensity, duration, and wavelength, precise spatio-temporal release of active molecules encapsulated in polymersomes is enabled. It is therefore a relevant tool for drug delivery in brain tissue, allowing treatment to be activated only in the targeted area, while leaving adjacent regions intact. Here, we demonstrated that our technology, which combines the precision of light stimulation with the translational advantages of nanomedicine, is adequate for brain tissue, reproducible, safe, and efficient, with high spatio-temporal resolution. While light scattering in brain tissue can be a challenge for applications requiring deeper penetration, the use of NIR- or red light-absorbing photocleavable chromophores would further enhance effective light penetration and release efficiency. Indeed, as long as photocleavage occurs, the dye itself is interchangeable in the approach described herein. Moreover, many different strategies are currently being developed to deliver light at a specific wavelength with minimal invasiveness. This includes microLED technologies and fluorescent organic nanoparticles (FONs) that can convert short-wavelength light to longer wavelengths, enabling photostimulation from outside the brain. Therefore, there is a high probability that light stimulation will become less invasive to brain tissue in the near future.

Moreover, electrophysiological recordings performed in this study provided convincing evidence for the spatial and temporal precision of the photorelease process. Spatial and temporal precision of molecular photorelease in the brain could represent a breakthrough for treating localised brain diseases, such as epilepsy, stroke, and Parkinson’s disease. For example, the general mechanism of anticonvulsants in epilepsy is to reduce brain excitability, either by lowering excitatory neurotransmission or by increasing inhibitory neurotransmission. However, in the treatment of focal-onset epilepsies, only the focal area of the brain requires reduced excitability. In contrast, systemic drug administration can be pathological for the rest of the brain. In this context, local targeting of the diseased brain area may be less invasive than systemic drug administration. Furthermore, the approach developed in our study enables a temporal control over drug delivery. This also applies to pathologies

such as epilepsy, where drug delivery would be ideally restricted to periods when epileptic seizures are arising (28).

In conclusion, precision light-triggered polymersome lysis to release a bio-active cargo represents a promising tool for both decrypting brain mechanisms and developing new therapeutic strategies, particularly considering recent advances in in vivo photopharmacology devices(29, 30) and the growing exploration of polymer-based systems for brain disease research(31). More broadly, this technology offers a path to closed-loop, light-guided chemical neuromodulation for the precision treatment of brain disorders.

RÉFÉRENCES

1. J. Muir, M. Anguiano, C. K. Kim, Neuromodulator and neuropeptide sensors and probes for precise circuit interrogation in vivo. Science 385, eadn6671 (2024).

2. Ö. D. Özçete, A. Banerjee, P. S. Kaeser, Mechanisms of neuromodulatory volume transmission. Mol Psychiatry 29, 3680–3693 (2024).

3. J. S. Katz, et al., Overcoming the Blood-Brain Barrier for Drug Delivery to the Brain. ACS Omega 10, 32544–32563 (2025).

4. W. M. Pardridge, The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. 2, 12 (2005).

5. J. Chen, et al., Rapid amyloid-β clearance and cognitive recovery through multivalent modulation of blood–brain barrier transport. Sig Transduct Target Ther 10, 331 (2025).

6. On the shuttling across the blood-brain barrier via tubule formation: Mechanism and cargo avidity bias | Science Advances. Available at: https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abc4397 [Accessed 26 February 2026].

7. H. D. Jackson, et al., Intracerebral delivery of antiseizure medications by microinvasive neural implants. Brain awae282 (2024). https://doi.org/10.1093/brain/awae282.

8. P. LaPenna, L. M. Tormoehlen, The Pharmacology and Toxicology of Third-Generation Anticonvulsant Drugs. J Med Toxicol 13, 329–342 (2017).

9. W. El Kheir, et al., Drug Delivery Systems in the Development of Novel Strategies for Glioblastoma Treatment. Pharmaceutics 14, 1189 (2022).

10. H. De Oliveira, J. Thevenot, S. Lecommandoux, Smart polymersomes for therapy and diagnosis: fast progress toward multifunctional biomimetic nanomedicines. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 4, 525–546 (2012).

11. H. De Oliveira, J. Thevenot, S. Lecommandoux, Smart polymersomes for therapy and diagnosis: fast progress toward multifunctional biomimetic nanomedicines. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology 4, 525–546 (2012).

12. Physical stimuli-responsive liposomes and polymersomes as drug delivery vehicles based on phase transitions in the membrane - Nanoscale (RSC Publishing). Available at: https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/nr/c8nr00923f [Accessed 26 February 2026].

13. X. Hu, et al., Stimuli-Responsive Polymersomes for Biomedical Applications. Biomacromolecules 18, 649–673 (2017).

14. O. Onaca, R. Enea, D. W. Hughes, W. Meier, Stimuli-Responsive Polymersomes as Nanocarriers for Drug and Gene Delivery. Macromolecular Bioscience 9, 129–139 (2009).

15. K. Deisseroth, Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. Nat. Neurosci. 18, 1213–1225 (2015).

16. S. Chen, et al., Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics. Science 359, 679–684 (2018).

17. A. Peyret, et al., Polymersome Popping by Light-Induced Osmotic Shock under Temporal, Spatial, and Spectral Control. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 56, 1566–1570 (2017).

18. L. Beauté, N. McClenaghan, S. Lecommandoux, Photo-triggered polymer nanomedicines: From molecular mechanisms to therapeutic applications. Advanced Drug Delivery Reviews 138, 148–166 (2019).

19. K. Ait Ouares, C. Beurrier, M. Canepari, G. Laverne, N. Kuczewski, Opto nongenetics inhibition of neuronal firing. Eur J Neurosci 49, 6–26 (2019).

20. I. Negut, B. Bita, Polymersomes as Innovative, Stimuli-Responsive Platforms for Cancer Therapy. Pharmaceutics 16, 463 (2024).

21. C. G. Palivan, et al., Advancing Artificial Cells with Functional Compartmentalized Polymeric Systems - In Honor of Wolfgang Meier. Biomacromolecules 25, 5454–5467 (2024).

22. H. Lomas, et al., Biomimetic pH Sensitive Polymersomes for Efficient DNA Encapsulation and Delivery. Advanced Materials 19, 4238–4243 (2007).

23. S. Thamboo, et al., Mimicking Cellular Signaling Pathways within Synthetic Multicompartment Vesicles with Triggered Enzyme Activity and Induced Ion Channel Recruitment. Advanced Functional Materials 29, 1904267 (2019).

24. Y. Yang, et al., Photoresponsive Drug Delivery Systems: Challenges and Progress. Advanced Functional Materials 34, 2402975 (2024).

25. F. A. Jerca, V. V. Jerca, R. Hoogenboom, Advances and opportunities in the exciting world of azobenzenes. Nat Rev Chem 6, 51–69 (2022).

26. J. Hee Lee, S. Lee, D. Kim, K. Jae Lee, Implantable Micro-Light-Emitting Diode (μLED)-based optogenetic interfaces toward human applications. Advanced Drug Delivery Reviews 187, 114399 (2022).

27. Y. Khan, et al., Synthesis of fluorescent organic nano-dots and their application as efficient color conversion layers. Nat Commun 13, 1801 (2022).

28. V. Kokkinos, N. D. Sisterson, T. A. Wozny, R. M. Richardson, Association of Closed-Loop Brain Stimulation Neurophysiological Features With Seizure Control Among Patients With Focal Epilepsy. JAMA Neurology 76, 800–808 (2019).

29. Y. Wu, et al., Wireless multi-lateral optofluidic microsystems for real-time programmable optogenetics and photopharmacology. Nat Commun 13, 5571 (2022).

30. Y. Zhang, et al., Battery-free, lightweight, injectable microsystem for in vivo wireless pharmacology and optogenetics. PNAS 116, 21427–21437 (2019).

31. A. Benaicha-Fernández, S. P. Atkinson, I. Conejos-Sánchez, M. Medel, M. J. Vicent, Polymer-based nanomedicines: Supporting multimodal approaches to glioblastoma Multiforme treatment. Advanced Drug Delivery Reviews 115735 (2025). https://doi.org/10.1016/j.addr.2025.115735.

ACKNOWLEDGEMENTS

The microscopy was performed at the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, and a member of the national infrastructure France BioImaging, supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). The help of Jérémie Teillon and Sébastien Marais is acknowledged. We thank the CIRCE (Behavioural Engineering Centre) facility of Bordeaux Neurocampus. We also thank Coralie Genevois for technical assistance at the Vivoptic platform, Univ. Bordeaux, CNRS, INSERM, TBM-Core, UAR 3427, US 5, F-33000 Bordeaux. Vivoptic is a France Life Imaging (FLI) labelled platform.

FUNDING

This study received financial support from ANR (ANR-24-CE18-5491-01 and ANR-23-CE06-0008), Bordeaux Emergence, Bordeaux INP, Fondation Medisite, and the French government in the framework of the University of Bordeaux's IdEx "Investments for the Future" program / GPR BRAIN_2030. R.K. is a recipient of Clément Fayat Foundation and Fondation pour la Recherche Médicale fellowships (France).

SUPPLEMENTARY DATA

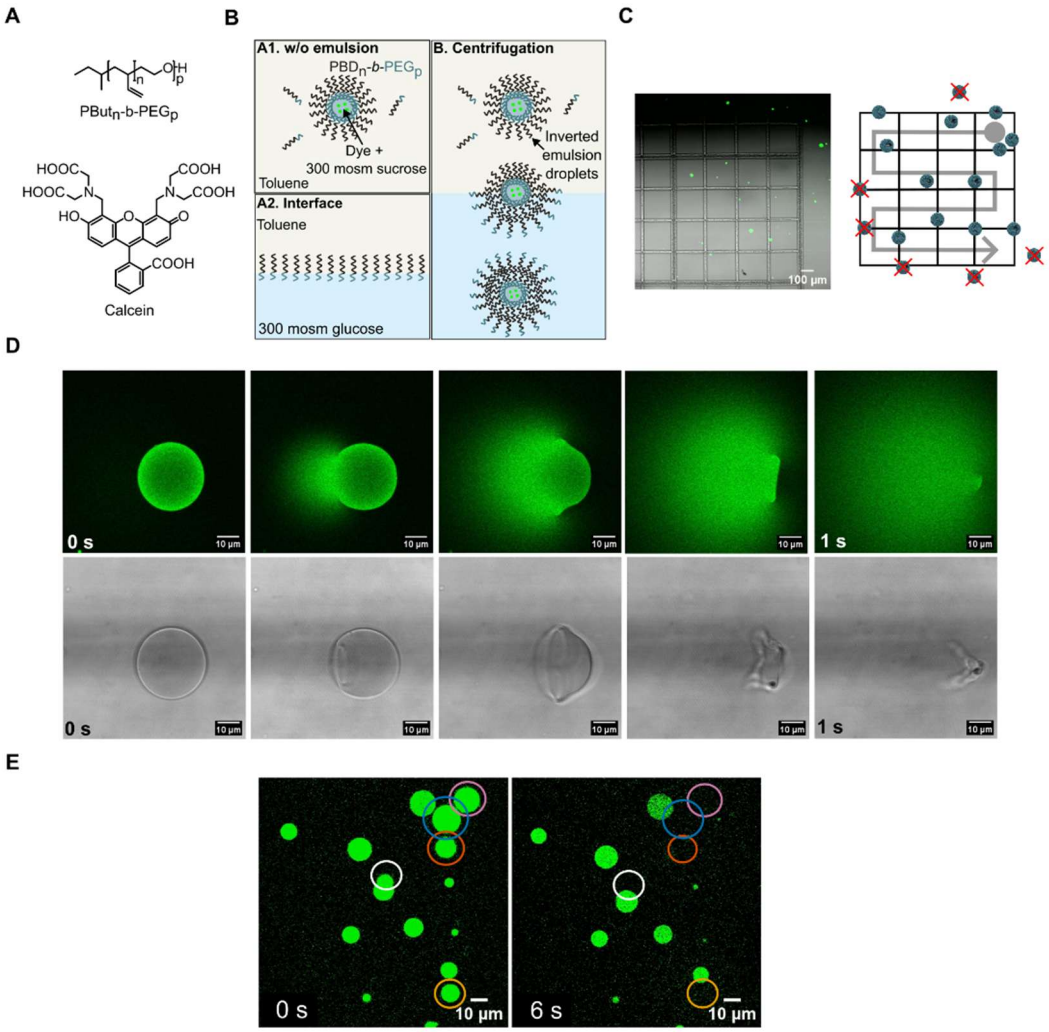


Figure S1. Principle of photosensitive polymersomes production, quantification and photostimulation. **(A)** Chemical structures of amphiphilic block copolymer, poly(butadiene)-*b*-poly(ethylene oxide) (PBut$_n$-*b*-PEG$_p$) and calcein. **(B)** Schematic representation of the formation of calcein-loaded polymersomes following the emulsion-centrifugation protocol. Sucrose-containing water droplets generated by emulsion and stabilized by the copolymer in toluene (A1) were deposited on a glucose solution-toluene interface containing the same copolymer (A2). Upon centrifugation, the droplets crossed the interface to form polymersomes in the glucose phase, thereby enabling the encapsulation of calcein in the sucrose phase (B). **(C)** (left) Merged confocal image showing polymersomes (green) overlaid with transmission image of the counting square. Polymersomes were distributed within the grid used to quantify their concentration. (right) Schematic representation of a counting square (1 × 1 mm, subdivided into 16 sub-squares of 0.25 mm) of a Fast-Read 102 cell. Polymersomes that were entirely inside or touching the upper/right edges (solid lines) were counted; those on the lower/left edges (dotted lines) were excluded to avoid double counting. **(D)** Confocal observation of the rupture of a calcein-loaded polymersome across 1 second in the green channel and transmission channel. **(E)** Confocal observation of the selective rupture of calcein-loaded polymersomes (green). Regions of interest (ROIs) were defined around selected polymersomes (circles) and allow specific illumination of these polymersomes. At t = 0 s, 5 vesicles (circled) were subjected to illumination at 488 nm.

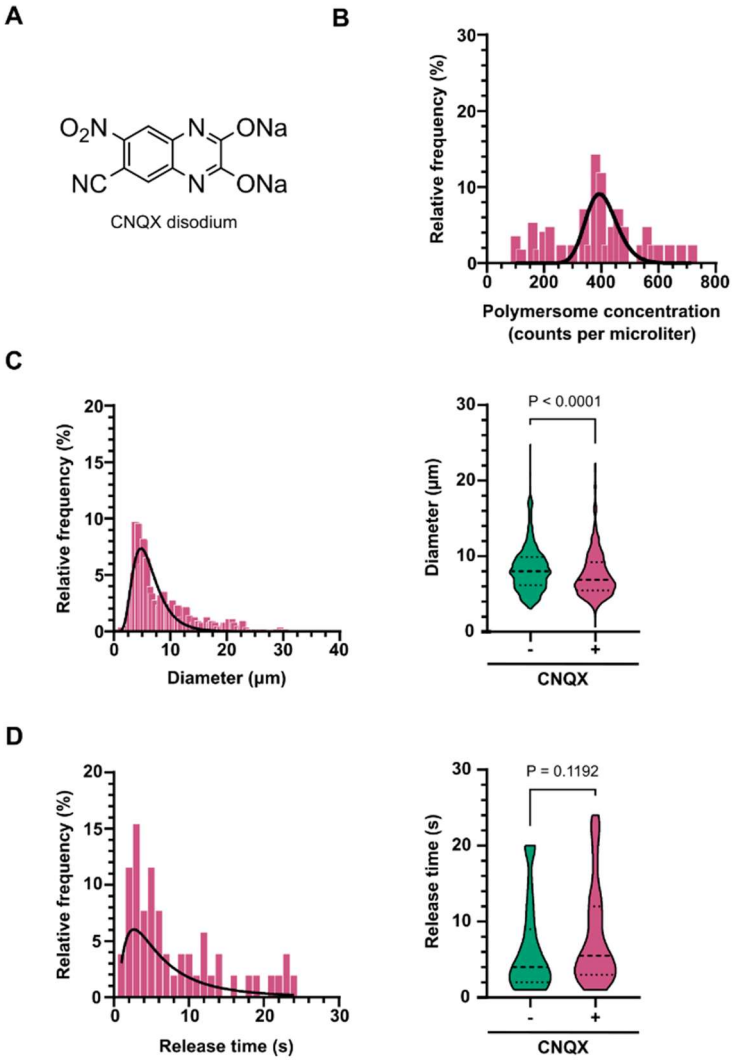


Figure S2. Effect of CNQX loading on physical properties of photosensitive polymersomes.
(A) Chemical structure of CNQX disodium salt. **(B-D)** Relative frequency (%) histograms with log-normal fits for polymersome concentration (counts/µL; b); diameter (µm; c), and release time (s; d). Right: violin plots comparing polymersomes-unloaded (−) vs. CNQX-loaded (+) polymersomes. CNQX loading reduces diameter ($P < 0.0001$), but not release time (t-test).

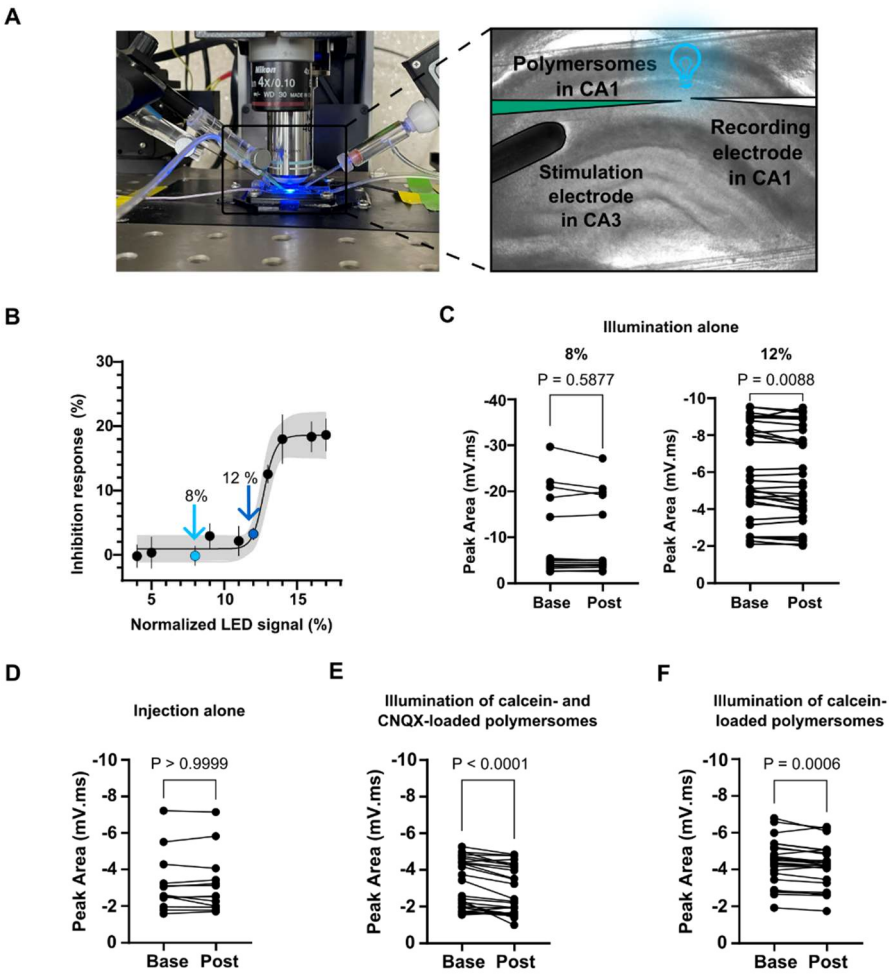


Figure S3. Photoactivation of CNQX-loaded polymersomes reduces CA3-CA1 synaptic transmission.
(A) Experimental setup (left, photography). Stimulation of CA3-CA1 connexion were elicited with electrical stimulating electrode, while fEPSP recording were made in CA1, with polymersomes injection close to recording pipette. **(B)** Inhibition of response (%) as a function of normalized LED signal intensity (%) with an adjusted sigmoid curve (4PL) (IC_{50} = 12.73% LED; Hill slope = 31.84). R^2 = 0.52. **(C-F)** fEPSP peak area (mV·ms; baseline vs. post-manipulation). As negative controls, illumination alone (8% or 12%) (C) and injection alone (D) show no significant change. Photostimulation of polymersomes loaded with calcein and CNQX showed a significant effect (E). Illumination of empty CNQX polymersomes (F). Dots represent individual trials, paired t-test.

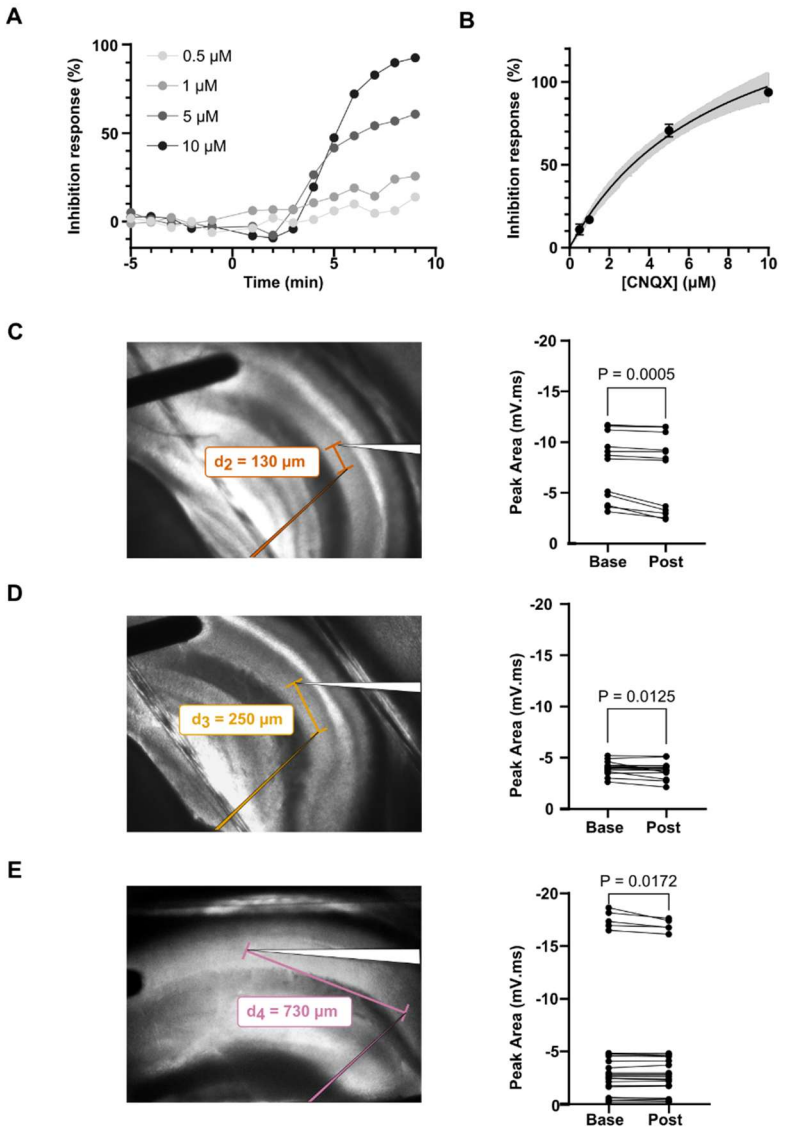


Figure S4. Efficacy and spatial specificity of controlled-release of CNQX in hippocampal slices.
(A) Time course of fEPSP inhibition with increasing CNQX concentrations (0.5–10 µM). b, [CNQX]–inhibition relationship (with fit and confidence band). **(C-E)** slice images (left) indicating the distance between the injection site and recording location (d_2=130 µm, d_3=250 µm, d_4=730 µm) with paired fEPSP peak area (mV·ms) measurements at baseline (Base) and after manipulation (Post); P values are shown for each condition.

Fig. 2	Variable analyzed	Groups compared	Test	n (per group)	Mean ± SEM	Test statistic (df)	P value
2a	Cell viability (%)	UT vs Normalized light signal	One-way ANOVA	6 (3 plates x 3 wells)	111 ± 5.13 109 ± 5.32 89.5 ± 7.03 117 ± 6.69 108 ± 7.02	F (5, 30) = 2.819	P = 0.0334
2b	Cell viability (%)	UT vs Polymersomes +/- light UT vs DMSO	One-way ANOVA	6 (3 plates x 3 wells)	110 ± 4.57 109 ± 5.73 115 ± 8.62 118 ± 4.05 102 ± 3.75 110 ± 4.80 100 ± 3.72 115 ± 4.18 104 ± 4.91 99.4 ± 2.16 52.0 ± 6.94	F (12, 64) = 15.28	**P < 0.0001 ******
Fig. 3	**Variable analyzed**	**Groups compared**	**Test**	**n (per group)**	**Mean ± SEM**	**Test statistic (df)**	**P value**
3b left	IBA1 48h relative weighted intensity polymersomes	Medium vs Polymersomes	Unpaired two-tailed t-test	5 ; 5	1.16 ± 0.0753 1.46 ± 0.167	t = 1.610, df = 8	P = 0.1461
3b right	GFAP 48h relative weighted intensity polymersomes	Medium vs Polymersomes	Unpaired two-tailed t-test	3 ; 5	1.41 ± 0.0222 1.21 ± 0.208	U = 3	P = 0.2500
3c left	IBA1 3W relative weighted intensity polymersomes	Medium vs Polymersomes	Unpaired two-tailed t-test	5 ; 3	1.05 ± 0.0156 1.01 ± 0.0104	t = 1.976, df = 6	P = 0.0955
3c right	GFAP 3W relative weighted intensity polymersomes	Medium vs Polymersomes	Unpaired two-tailed t-test	5 ; 4	1.20 ± 0.665 1.27 ± 0.0775	t = 0.7491, df = 7	P = 0.4782
Fig. 4	**Variable analyzed**	**factors**	**Test**	**n (per group)**	**Mean ± SEM**	**Test statistic (df)**	**P value**
4c left	Inhibition response (%)	Interaction	Two-way ANOVA	16-31	8% without: -0.166 ± 1.60 12 % without: 3.27 ± 0.948 8% with: 12.7 ± 2.60 12% with : 23.4 ± 6.10	F(1, 86) = 1.453	P = 0.2314
		+/- Polymersomes				F(1, 86) = 30.60	**P < 0.0001****
		Light intensity (8% or 12%)				F(1,86) = 5.548	**P = 0.0208***
Fig. S2	**Variable analyzed**	**Groups compared**	**Test**	**n (per group)**	**Mean ± SEM**	**Test statistic (df)**	**P value**
S2c left	Diameter (µm)	+/- CNQX	Unpaired two-tailed t-test	372 ; 86	8.37 ± 0.161 7.62 ± 0.156	U = 59666	**P < 0.0001****
S2d right	Release time (s)	+/- CNQX	Unpaired two-tailed t-test	41 ; 52	6.39 ± 0.904	U = 865	P = 0.1192

					8.12 ± 0.904		
Fig. S3	**Variable analyzed**	**Groups compared**	**Test**	**n (per group)**	**Mean ± SEM**	**Test statistic (df)**	**P value**
S3c left	Peak Area (mV.ms)	Base vs Post	Paired two-tailed t-test	16	-9.31 ± 2.20 -9.08 ± 2.06	W = 22	P = 0.5877
S3c right	Peak Area (mV.ms)	Base vs Post	Paired two-tailed t-test	31	-6.03 ± 0456 -5.90 ± 0.455	W = 250	**P= 0.0088****
S3d	Peak Area (mV.ms)	Base vs Post	Paired two-tailed t-test	13	-3.23 ± 0.443 -3.20 ± 0.455	W = -1	P > 0.9999
S3e	Peak Area (mV.ms)	Base vs Post	Paired two-tailed t-test	26	-3.25 ± 0.263 -2.88 ± 0.258	W = 309	**P < 0.0001****
S3f	Peak Area (mV.ms)	Base vs Post	Paired two-tailed t-test	26	-4.39 ± 0.231 -4.22 ± 0.224	W = 257	**P = 0.0006*****
Fig. S4	**Variable analyzed**	**Groups compared**	**Test**	**n (per group)**	**Mean ± SEM**	**Test statistic (df)**	**P value**
S4c	Peak Area (mV.ms)	Base vs Post	Paired two-tailed t-test	12	-7.56 ± 0.946 -6.99 ± 1.07	W = 78	**P = 0.0005*****
S4d	Peak Area (mV.ms)	Base vs Post	Paired two-tailed t-test	15	-4.02 ± 0.171 -3.80 ± 0.204	W = 86	**P = 0.0125***
S4e	Peak Area (mV.ms)	Base vs Post	Paired two-tailed t-test	27	-5.37 ± 1.17 -5.26 ± 1.13	W = 185	P = 0.0172

Table S1. Detail of statistical analysis

Fiber (raw setting) (%)	Measured power at ferrule (mW)	Normalized (%)
1	0.6	1
2	2.1	5
3	3.6	8
4	8.8	20
5	19.3	45
6	31.5	73

Table S2. Fiber optic power delivery (470 nm blue). Power output from 400 µm core fiber (NA = 0.50), measured at 1.25 mm ferrule output using Thorlabs power meter. Normalized % calculated relative to maximum power at 100% setting.

CoolLED % (raw setting)	Mesured power (40x objective, mW)	Normalized (%)
1	1.5	4
2	2.4	5
3	3.4	8
4	3.8	9
5	4.6	11
6	5.2	12
7	5.7	13
8	6.3	14
9	6.8	16
10	7.4	17
15	9.8	23
20	11.9	28
30	15.8	37
40	19.6	45
50	23.4	54
60	27.1	63
70	31.1	72
80	35.0	81
90	39.0	90
100	43.2	100

Table S3. CoolLED power calibration at 40x objective (470 nm blue). CoolLED pE-300 irradiance measurements through 40x 0.8 NA objective on Olympus scope. Power measured at focus with Thorlabs power meter, averaged 5 s per reading. Normalized % calculated as (measured power / max power at 100%) × 100.

Video S1. Calcein release from PBut-*b*-PEG polymersome (green channel) (10 mM calcein, λ_{exc} = 488 nm).

Video S2. Calcein release from PBut-*b*-PEG polymersome (transmission) (10 mM calcein, λ_{exc} = 488 nm).

Video S3. Calcein release following repeated photostimulation of PBut-*b*-PEG polymersomes (green channel) (10 mM calcein, λ_{exc} = 488 nm).

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1. SYNTHESE DES PRINCIPAUX RESULTATS

Les résultats obtenus au cours de cette thèse reposent sur une démarche progressive ayant conduit à l'optimisation du système de polymersomes photoactivables puis à sa validation biologique. L'organigramme suivant résume les principales étapes de développement et les conclusions associées **(Figure 70**).

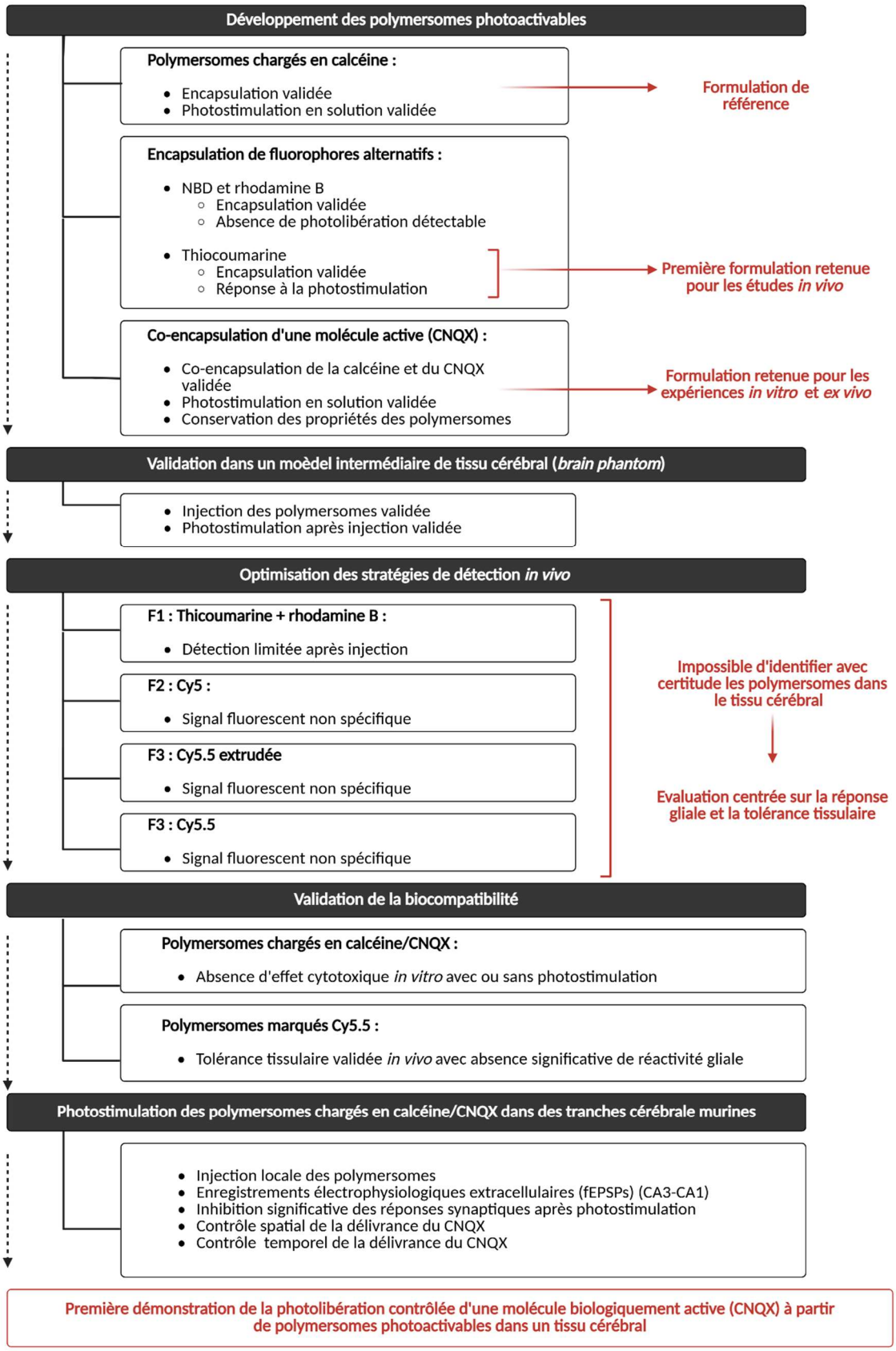


Figure 70. Vue d'ensemble des étapes de développement et des principaux résultats obtenus avec les polymersomes photoactivables.

2. ATTEINTE DES OBJECTIFS DE LA THESE

Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour objectif de développer des polymersomes photoactivables permettant une délivrance contrôlée de molécules actives au sein du système nerveux central. Ce projet reposait sur trois enjeux complémentaires : (i) concevoir des polymersomes photoactivables adaptés aux contraintes d'une application dans le tissu cérébral ; **(ii)** évaluer leur inocuité ; **(iii)** démontrer leur capacité à induire une photolibération efficace de molécules actives et à moduler l'activité neuronale.

Les résultats obtenus ont permis d'établir une première preuve de concept d'une stratégie de délivrance moléculaire contrôlée par la lumière, reposant sur l'utilisation de polymersomes photoactivables. Les différentes approches développées au cours de cette thèse démontrent la faisabilité de cette technologie dans un contexte cérébral et mettent en évidence son potentiel pour le contrôle spatio-temporel de la délivrance de molécules actives (**Figure 71**).

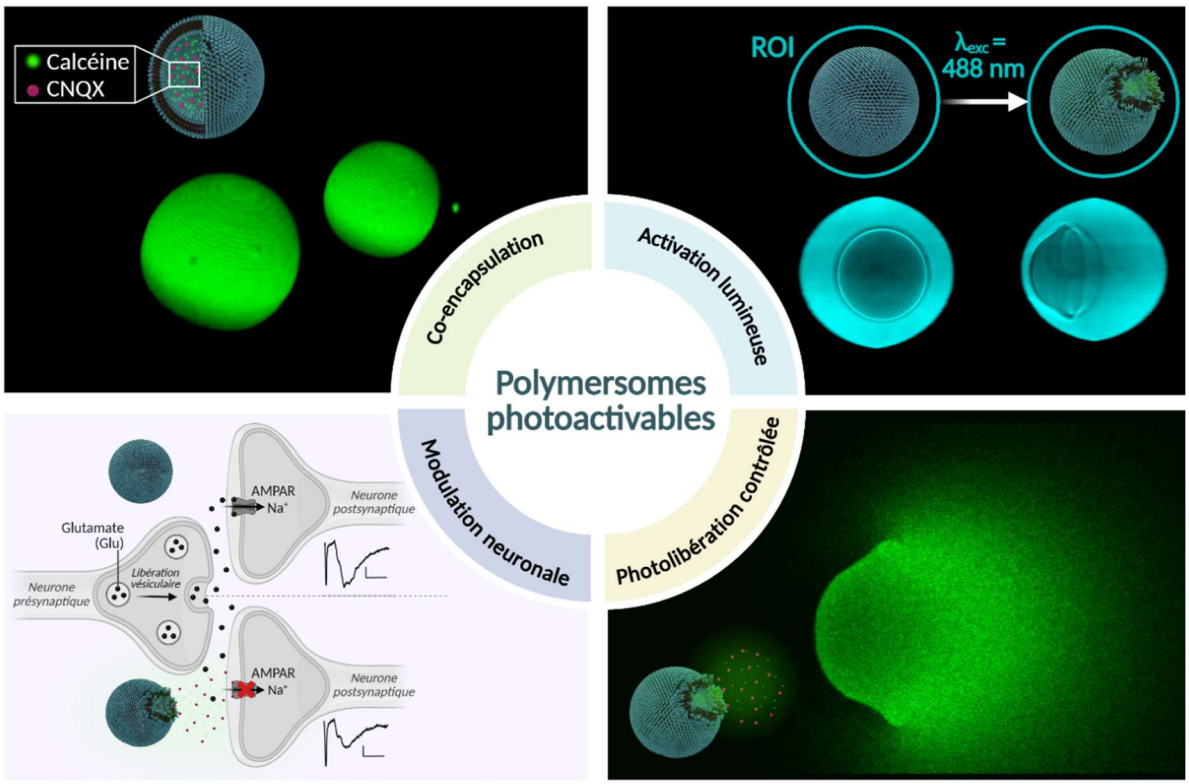


Figure 71. Vue d'ensemble du système de polymersomes photoactivables développé dans cette thèse. Les polymersomes permettent la co-encapsulation d'un fluorophore photosensible et d'une molécule d'intérêt. Une stimulation lumineuse déclence la rupture membranaire et la photolibération contrôlée du cargo encaspulé. Cette stratégie permet une modulation neuronale contrôlée, illustrée ici par l'inhibition de la transmission synaptique après photolibération du CNQX. *Réalisé sur Biorender.com.*

2.1. DEVELOPPEMENT DES POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES

Le développement de polymersomes photoactivables adaptés à une utilisation dans le système nerveux central constituait le premier objectif de cette thèse. Les résultats obtenus ont permis d'identifier une formulation capable de co-encapsuler un fluorophore photosensible et une molécule active, de conserver son intégrité jusqu'à la stimulation lumineuse et d'induire une libération contrôlée dans un environnement biologique.

Le choix d'une taille micrométrique (entre 1 et 10 µm) et non nanométrique (< 1 µm) constitue l'une des particularités des polymersomes développés. Contrairement aux approches de nanomédecine visant à administrer des molécules au cerveau par voie systémique et nécessitant donc des nanovésicules pour le franchissement de la BHE, la stratégie développée ici repose sur une administration locale directement dans le tissu cérébral. Bien qu'une taille micrométrique puisse limiter leur diffusion passive dans le tissu, cette contrainte apparaît moins critique dans le cadre d'une stratégie reposant sur une administration locale et apporte même une plus grande précision spatiale. Elle présente également l'avantage d'augmenter le volume interne disponible pour l'encapsulation. Les grandes vésicules unilamellaires (GUV) présentent ainsi théoriquement une capacité d'encapsulation supérieure à celle des systèmes de plus petite taille (Rideau et al. 2018), ce qui peut constituer un avantage pour délivrer une quantité suffisante de molécule active. Ce choix s'inscrit également dans la continuité des travaux ayant conduit au développement du mécanisme de photoactivation exploité dans cette thèse. En effet, la rupture membranaire induite par la calcéine a initialement été développée et caractérisée sur des GUVs. La conservation d'une architecture de taille plus petite (< 10 µm) mais comparable a ainsi permis de transposer ce mécanisme à un système capable d'encapsuler et de photolibérer une molécule d'intérêt dans un contexte biologique.

Au-delà de leur taille, la stabilité des formulations représente une condition indispensable au fonctionnement du système. Les polymersomes développés dans cette thèse ont conservé leur capacité de photolibération plusieurs semaines après leur formulation, indiquant le maintien des propriétés nécessaires au mécanisme de photoactivation au cours du stockage. Cette stabilité suggère notamment l'absence de fuite majeure du contenu encapsulé, condition indispensable au maintien du gradient osmotique permettant la rupture déclenchée par la lumière.

L'intérêt de cette approche repose également sur la possibilité d'associer plusieurs composés au sein d'une même vésicule. Les résultats obtenus ont démontré la possibilité de co-encapsuler deux composés présentant des fonctions distinctes : la calcéine, utilisée comme fluorophore photosensible permettant l'induction de la rupture membranaire, et le CNQX, utilisé comme molécule active permettant de mesurer l'effet biologique de la photolibération. Cette co-encapsulation démontre que la stratégie développée permet d'associer au sein d'une même vésicule un élément déclencheur de la photoactivation et un composé d'intérêt dont la libération peut être contrôlée spatialement et temporellement, et qui n'est pas altéré par la photostimulation elle-même. Cette capacité est particulièrement importante, car elle montre que le mécanisme de photoactivation et la molécule active peuvent être réunis au sein d'un même vecteur sans compromettre le fonctionnement du système.

La propriété la plus déterminante pour cette technologie reste néanmoins l'efficacité de la photoactivation. Les expériences réalisées avec la calcéine ont montré que ce fluorophore permettait d'induire de manière reproductible la rupture des polymersomes sous illumination. Cette observation confirme que la stratégie reposant sur l'augmentation de la pression osmotique interne constitue une approche efficace pour déclencher la photolibération du contenu encapsulé et valide le principe de photoactivation sur lequel repose l'ensemble du système développé dans cette thèse.

Ainsi, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis d'établir les bases d'un système de polymersomes photoactivables capables d'associer encapsulation, photoactivation et libération contrôlée d'un composé d'intérêt. Ces résultats démontrent la faisabilité de cette approche dans un contexte cérébral. Ils mettent aussi en évidence plusieurs axes d'optimisation, notamment la quantité de molécule pouvant être encapsulée et délivrée, la maîtrise de la polydispersité des formulations (variabilité dans les tailles des polymersomes) ainsi que l'adaptation du système à de nouveaux cargos thérapeutiques, incluant potentiellement des petites molécules actives différentes du CNQX, mais aussi des biomacromolécules et des vecteurs viraux.

2.2. EVALUATION DE LA BIOCOMPATIBILITE

Le deuxième objectif de cette thèse visait à évaluer la biocompatibilité des polymersomes photoactivables dans différents modèles biologiques pertinents pour une

application cérébrale. L'introduction d'un système de délivrance au sein du système nerveux central impose en effet de démontrer que celui-ci ne perturbe pas, à lui seul, le fonctionnement des cellules ou du tissu ciblé. Même si l'observation des polymersomes dans le tissu cérébral reste un défi, les résultats obtenus montrent une bonne tolérance des formulations développées et les tests réalisés n'ont jamais montré d'effet nocif (les souris se portaient très bien même 3 semaines après les injections).

De même, les expériences de viabilité cellulaire réalisées sur des cultures corticales n'ont mis en évidence aucun effet cytotoxique détectable des formulations contenant la calcéine et le CNQX, y compris à la concentration maximale testée. Ces résultats constituent une première indication de la compatibilité des polymersomes avec des cellules neuronales et suggèrent que les matériaux utilisés pour leur formulation ne présentent pas de toxicité aiguë détectable dans les conditions étudiées.

Cette évaluation a été complétée par des expériences réalisées sur tranches de cerveau, permettant d'examiner l'impact fonctionnel des formulations dans un environnement neuronal préservant l'organisation des circuits locaux. L'absence d'effet significatif sur la transmission synaptique après administration des polymersomes en l'absence de photostimulation suggère que les polymersomes n'altèrent pas directement l'activité neuronale dans les conditions étudiées. Des études préliminaires à ma thèse avec d'autres types de polymersomes avaient également montré une absence d'effet sur les propriétés électrophysiologiques de neurones enregistrés en patch-clamp. Cette observation constitue un point essentiel pour l'interprétation des expériences de photolibération, puisqu'elle indique que les modifications fonctionnelles observées après illumination des polymersomes résultent de la libération du composé encapsulé et non de la simple présence des vésicules dans le tissu.

Enfin, l'étude réalisée après administration intracérébrale de polymersomes marqués à la cyanine 5.5 n'a pas mis en évidence d'augmentation significative de la réponse gliale à court ou à plus long terme, suggérant que l'injection locale des formulations ne déclenche pas de réaction inflammatoire majeure dans les conditions étudiées. Bien que la réponse gliale ne constitue qu'un indicateur partiel de la tolérance cérébrale, ces résultats fournissent une première indication encourageante de la compatibilité des formulations avec le tissu cérébral après administration intracérébrale.

Ainsi, l'évaluation réalisée à l'échelle cellulaire, tissulaire et *in vivo* apporte des éléments convergents en faveur de la bonne tolérance des polymersomes photoactivables dans les conditions étudiées. Ces résultats constituent une étape essentielle pour envisager l'utilisation future de ces formulations dans des applications cérébrales. Cependant, plusieurs questions restent ouvertes concernant le devenir après administration, leur élimination du tissu cérébral et leur comportement lors d'expositions répétées. Ces aspects constitueront des étapes importantes pour la poursuite du développement de cette technologie.

2.3. DEMONSTRATION DE LA PHOTOLIBERATION

Une fois le système développé et sa compatibilité biologique démontrée, le troisième objectif de cette thèse consistait à établir que les polymersomes photoactivables permettaient une photolibération contrôlée d'une molécule active capable de moduler l'activité neuronale.

Les expériences réalisées sur tranches hippocampiques ont montré que l'illumination des polymersomes contenant la calcéine et le CNQX induit une diminution significative de la transmission synaptique, alors qu'aucun effet comparable n'est observé en l'absence de photostimulation ou en l'absence de molécule active encapsulée, ou avec la photostimulation sans polymersomes. Ces résultats démontrent que la modulation observée résulte de la photolibération du CNQX. Ils valident simultanément plusieurs propriétés essentielles du système : l'efficacité du mécanisme de photoactivation dans un tissu cérébral, la rupture des polymersomes sous illumination, l'absence d'effet de la photostimulation seule, ainsi que le maintien de l'activité pharmacologique du CNQX après sa libération.

Au-delà de cette validation fonctionnelle, les résultats obtenus mettent en évidence deux propriétés particulièrement intéressantes de cette technologie : le contrôle temporel et le contrôle spatial de la délivrance. D'une part, l'effet biologique peut être déclenché à la demande par l'application d'un stimulus lumineux, permettant de dissocier le moment de l'administration de celui de la libération du composé actif. D'autre part, l'existence d'un gradient d'efficacité en fonction de la distance entre le site de photostimulation et le site d'enregistrement indique que l'effet du composé libéré demeure principalement localisée autour de la zone illuminée. Cette résolution spatio-temporelle constitue l'un des principaux intérêts des approches photoactivables pour les applications en neurosciences.

Ainsi, le troisième objectif de cette thèse peut être considéré comme atteint. Les résultats obtenus constituent une première démonstration de modulation de l'activité neuronale par photolibération d'une molécule active encapsulée dans des polymersomes au sein d'un tissu cérébral *ex vivo*. Ils valident le principe général de cette stratégie de délivrance contrôlée et démontrent qu'il est possible de combiner encapsulation, photoactivation et effet pharmacologique au sein d'un même système. L'extension de cette approche à des modèles *in vivo* constituer désormais l'étape suivante essentielle du projet, afin d'implémenter cette nouvelle technologie dans des projets de recherche fondamentale et préclinique.

3. LIMITES ET VERROUS DE L'APPROCHE

3.1. PHOTOSTIMULATION

La lumière constitue l'un des principaux atouts des polymersomes photoactivables développés dans cette thèse, en permettant de déclencher la libération d'une molécule active de manière contrôlée dans le temps et l'espace. La lumière est très adaptée à l'intervention dans le syst-me nerveux central, car celle-ci est déjà très largement utilisée dans la recherche en neurosciences, avec l'optogénétique et plus récemment, la photométrie de fibre ; Cependant, son utilisation comme stimulus dans le système nerveux central impose plusieurs contraintes et limites qui doivent être prises en compte pour le développement futur de cette approche.

Dans cette thèse, la rupture des polymersomes a été induite par une illumination dans le domaine du visible, à 488 nm sous microscope confocal lors des expériences de caractérisation et de photolibération en solution, et à 470 nm à l'aide d'un système d'illumination CoolLED couplé au microscope utilisé pour les enregistrements électrophysiologiques. Ces longueurs d'onde présentent l'avantage de fournir une énergie photonique suffisante pour induire efficacement les réactions de clivage nécessaires au mécanisme de rupture membranaire. De plus, elles ont été choisies car ce sont également les premières à être utilisées pour l'optogénétique (Towne and Thompson 2016) et la photométrie de fibre (Kielbinski and Bernacka 2024). C'est pourquoi il était pertinent de commencer la preuve de concept avce ces longueurs d'ondes. Néanmoins, la lumière visible est fortement absorbée et diffusée par les tissus biologiques, ce qui limite sa pénétration en

profondeur et restreint l'activation de structures cérébrales éloignées de la surface ou du site d'injection (Gong et al. 2021). Dans le cadre de la stratégie développée ici, cette limite peut être contournée par l'utilisation de dispositifs optiques implantables permettant d'apporter localement la lumière au niveau de la région cérébrale ciblée. Cependant, cette approche implique le recours à un dispositif plus invasif et nécessite donc d'optimiser les paramètres d'illumination afin de limiter les effets biologiques associés à une exposition lumineuse répétée.

Au-delà des contraintes liées à la pénétration de la lumière dans les tissus, l'utilisation de ce stimulus nécessite aussi de considérer les effets biologiques induits directement par l'illumination du tissu cérébral. Dans cette thèse, les expériences réalisées sur tranches cérébrales ont montré qu'une stimulation lumineuse seule pouvait modifier la transmission synaptique si elle était délivrée à trop haute intensité, indépendamment de la présence des polymersomes photoactivables. Cette observation souligne la nécessité de distinguer l'effet spécifique associé à la photolibération du composé encapsulé des effets directement induits par la lumière. Cette problématique n'est d'ailleurs pas spécifique aux polymersomes photoactivables et a également été décrite dans d'autres approches utilisant la lumière comme outil de modulation neuronale, notamment l'optogénétique. Plusieurs études ont montré que des paramètres d'illumination couramment utilisés pouvaient induire des modifications de l'activité de neurones ne présentant pourtant aucune expression d'opsine (Ait Ouares et al. 2019; Owen, Liu, and Kreitzer 2019). Parmi elles, une étude a notamment montré que des stimulations lumineuses dans les gammes utilisées en optogénétique pouvaient modifier l'activité électrique de neurones natifs, avec des effets attribués en partie à une augmentation locale de la température du tissu (Ait Ouares et al. 2019). Ces observations soulignent donc l'importance d'optimiser les paramètres d'illumination afin de maximiser l'efficacité de photolibération tout en limitant les effets non spécifiques sur l'activité neuronale.

Ainsi, l'utilisation de la lumière comme stimulus impose un compromis entre une activation suffisante des polymersomes et la limitation des effets biologiques intrinsèques liés à l'illumination. La définition de cette fenêtre d'activation constituera donc une étape essentielle pour exploiter pleinement le potentiel de cette technologie, en garantissant que l'effet biologique observé résulte majoritairement de la photolibération du composé encapsulé et non des effets propres à l'illumination. En ce sens, le dispositif utilisé au cours de

cette thèse est une première version, et on peut envisager que dans plusieurs années, l'amélioration des technologies permettra un système plus performant et donc moins invasif qu'aujourd'hui.

3.2. POLYMERSOMES

Les polymersomes développés dans cette thèse présentent plusieurs propriétés favorables pour une stratégie de délivrance contrôlée, notamment leur capacité à confiner une molécule active, à la protéger avant stimulation et à permettre une libération déclenchée à la demande. Cependant, plusieurs verrous restent à lever afin de mieux maîtriser les performances du système, notamment la quantité de composé pouvant être délivrée, son adaptation à différents cargos et le contrôle des propriétés de formulation.

Dans cette thèse, la stratégie développée repose sur une encapsulation passive, dans laquelle la molécule d'intérêt est incorporée dans le compartiment aqueux interne des polymersomes lors du processus de formation des vésicules. Cette approche a permis d'encapsuler efficacement deux petites molécules hydrophiles, la calcéine et le CNQX, dont les propriétés étaient compatibles avec la formulation utilisée. Cependant, la quantité de composé pouvant être encapsulée puis délivrée constitue un premier verrou pour l'élargissement de cette approche à d'autres applications. Elle dépend à la fois des propriétés du cargo (le composé d'intérêt), notamment sa solubilité dans la phase aqueuse utilisée lors de la formulation, et des caractéristiques intrinsèques des polymersomes, telles que le volume interne disponible et les conditions de formulation. Cette question est particulièrement importante dans une perspective thérapeutique, car de nombreuses molécules d'intérêt pour le système nerveux central présentent des propriétés physicochimiques favorisant leur passage à travers la BHE, notamment une lipophilie élevée, mais limitant leur solubilité aqueuse (Gosselet et al. 2021; William M. Pardridge 2005). Ces caractéristiques peuvent ainsi réduire leur compatibilité avec une stratégie d'encapsulation passive dans le compartiment aqueux des polymersomes développés dans cette thèse. Ainsi, l'identification de molécules compatibles avec le procédé d'émulsion-centrifugation utilisé dans cette thèse, tout en conservant les propriétés de photoactivation et de photolibération des polymersomes, constituera une étape essentielle pour élargir les applications potentielles de cette

technologie. Ces améliorations peuvent aussi se faire par la modification des molécules d'intérêt, notamment pour augmenter leur solubilité.

Un deuxième enjeu concerne la détermination de la dose biologiquement efficace effectivement délivrée après photostimulation. Contrairement à une administration directe de molécule libre, la réponse biologique obtenue dépend ici de plusieurs paramètres successifs, incluant la quantité de composé présente dans chaque vésicule, le nombre de polymersomes administrés ainsi que la proportion de vésicules effectivement activées par la stimulation lumineuse. Dans cette thèse, la photolibération du CNQX a permis d'obtenir une modulation fonctionnelle de la transmission synaptique, démontrant que la quantité de composé libérée localement est suffisante pour induire un effet biologique. Cependant, la concentration exacte de polymersomes introduite dans chaque tranche cérébrale ainsi que le nombre de vésicules effectivement rompues lors de l'illumination ne pouvaient pas être déterminés avec précision. La variabilité de ces paramètres peut ainsi contribuer aux différences d'inhibition de la transmission synaptique observées entre les expériences, mesurées par la diminution de l'amplitude du fEPSP après photostimulation. Nous avons observé que pour un même pool de polymersomes, il était possible de photostimuler plusieurs fois, avec un effet incrémental sur l'inhibition de la transmission synaptique, mais ces résultats pourraient être afinés par l'utilisation de microscopie plus précise. Pour cela, nous avons réalisés des tests préliminaires avec un microscope bi-photon avec la plateforme BIC de Bordeaux, mais ceux-ci ne se sont pas montrés concluants, dû à des limitations techniques que nous n'avons pas eu le temps de résoudre. L'établissement d'une relation quantitative entre la quantité de polymersomes administrée, la quantité de molécule active délivrée localement et l'effet fonctionnel obtenu constituera donc une étape essentielle pour définir des conditions de stimulation reproductibles et prédictibles. Cette relation dose-effet constitue un élément central pour envisager une utilisation quantitative et reproductible de cette technologie.

Enfin, le contrôle de la polydispersité en taille des polymersomes constitue également un paramètre à considérer pour l'évolution future du système. Le protocole d'émulsion-centrifugation utilisé dans cette thèse permet actuellement d'obtenir des polymersomes photoactivables fonctionnels avec un diamètre autour de 7-8 µm, mais ne permet un contrôle précis de l'homogénéité des populations obtenues. Cette variabilité pourrait influencer certains paramètres tels que la quantité de composés encapsulés par vésicule, la distribution

du cargo après administration ou encore la reproductibilité de la réponse biologique obtenue. La maîtrise de ce paramètre constitue donc un verrou important pour améliorer la standardisation des formulations et renforcer la prédictibilité des effets biologiques obtenus après photostimulation. La piste d'amélioration que nous sommes en train de poursuivre pour cela, est l'utilisation de l'extrusion, pour se rapprocher de la taille de 1 µm, qui apparaît en théorie idéale pour des vésicules qui resteraient dans la mactrice extracellulaire. L'extrusion devrait permettre de réduire cette polydispersité, en plus de réduire la taille moyenne des vésicules.

3.3. EVALUATION BIOLOGIQUE

Les résultats obtenus au cours de cette thèse apportent une première indication de la tolérance biologique des polymersomes photoactivables et démontrent leur fonctionnement dans un contexte cérébral expérimental. Néanmoins, plusieurs aspects restent à approfondir afin de mieux caractériser leur tolérance, leur devenir dans le tissu cérébral et leurs limites d'utilisation.

Tout d'abord, les études de viabilité cellulaire réalisées *in vitro* ont montré l'absence d'effet cytotoxique détectable jusqu'à la concentration maximale testée. Cependant, elles ne permettent pas de déterminer les limites de tolérance du système ni d'établir une relation dose-réponse complète. Des études complémentaires seront nécessaires afin d'identifier les concentrations à partir desquelles les polymersomes pourraient altérer la viabilité cellulaire et de mieux définir la fenêtre d'utilisation du système.

Par ailleurs, l'évaluation *in vivo* réalisée au cours de cette thèse repose principalement sur l'analyse de la réponse gliale après administration intracérébrale de polymersomes marqués à la cyanine 5.5. Bien que ces résultats constituent une première indication encourageante de la tolérance cérébrale des formulations, ils devront être confirmés avec les formulations finales contenant la calcéine et le CNQX afin de vérifier que ces observations sont transposables au système utilisé pour les expériences de photolibération.

Un verrou important concerne la caractérisation du devenir des polymersomes après injection intracérébrale. Malgré plusieurs tentatives visant à développer une stratégie de détection adaptée, il n'a pas été possible d'identifier de manière fiable les polymersomes dans le tissu cérébral après administration. Plusieurs approches de formulation et de marquage ont

été explorées afin d'améliorer leur détectabilité, sans toutefois permettre d'obtenir un signal suffisamment spécifique et robuste pour suivre leur localisation au cours du temps. En effet, ces objets n'ont jamais été observés dans le vivant, donc il est difficile de savoir à quoi s'attendre comme signal. Il est possible que l'injection dans le tissu cérébral réduise leur taille, de par l'environnement contraint. De plus, nous avons quasi-systématiquement observé un signal dans l'hémisphère contrôle (injecté avec une solution ne contenant pas de polymersomes) qui était très proche du signal observé dans l'hémisphère injecté avec les polymersomes. Il est connu que l'injection de solution dans le cerveau crée temporairement une réaction inflammatoire dans le tissu neuronal, mais ceci est finalement assez rarement contrôlé dans les études. Dans ce travail de thèse, la difficulté à observer les polymersomes dans le tissu cérébral après injection limite la compréhension du devenir des polymersomes dans le compartiment cérébral, notamment leur diffusion à partir du site d'injection, leurs interactions éventuelles avec les cellules du tissu cérébral, leur persistance locale ainsi que leur élimination progressive. L'obtention de données permettant de suivre le devenir des polymersomes après administration constitue donc un défi important pour la poursuite du développement de cette technologie et pour l'évaluation précise de son comportement dans le tissu cérébral.

4. PERSPECTIVES

4.1. OPTIMISATION DU SYSTEME

Une première perspective consistera à optimiser les propriétés de formulation des polymersomes afin d'adapter le système aux différentes applications envisagées, tout en préservant les caractéristiques essentielles démontrées dans cette thèse, à savoir la stabilité des vésicules, la co-encapsulation d'un fluorophore photosensible et d'une molécule d'intérêt, ainsi que la capacité de photolibération contrôlée.

Une première approche pourrait viser à améliorer le contrôle de la distribution en taille des polymersomes. Le protocole d'émulsion-centrifugation utilisé dans cette thèse permet actuellement d'obtenir des polymersomes photoactivables, mais ne permet pas un contrôle précis de la distribution en taille des vésicules obtenues. D'autres méthodes de formulation pourraient théoriquement permettre d'obtenir des populations plus homogènes (J. S. Lee and Feijen 2012; Massignani, Lomas, and Battaglia 2010), mais leur compatibilité avec les

mécanismes de photoactivation développés dans cette thèse reste à démontrer. Une stratégie permettant de conserver le procédé d'émulsion-centrifugation tout en améliorant l'homogénéité des formulations repose donc sur l'utilisation d'étapes complémentaires, telles que l'extrusion membranaire. Des résultats préliminaires obtenus en fin de thèse suggèrent que cette approche est compatible avec le maintien de la photoactivation du système. Des polymersomes chargés en calcéine et extrudés jusqu'à une taille moyenne de 5 µm ont ainsi conservé une capacité de photostimulation efficace en solution sous illumination au microscope confocal (**Figure 72**). Ces premiers résultats suggèrent qu'une optimisation de la distribution en taille peut être envisagée sans compromettre la photoactivation, et ouvrent des perspectives pour un meilleur contrôle des caractéristiques des formulations.

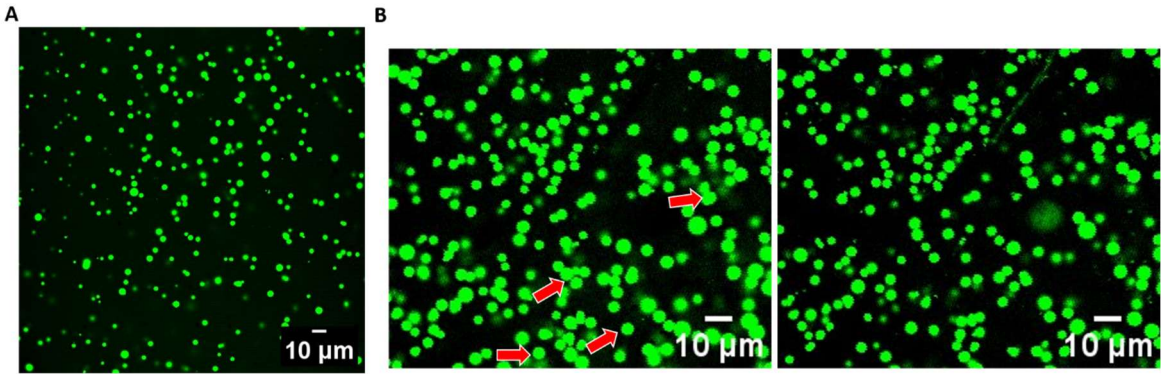


Figure 72. Photostimulation en solution de polymersomes extrudés à 5 µm chargés en calcéine.
(A) Image obtenue par microscopie confocale de polymersomes chargés en calcéine après extrusion. **(B)** Images confocales représentatives avant (droite) et après (gauche) illumination à 488 nm. La photostimulation induit la rupture de certains polymersomes (flèches rouges), conduisant à la libération de la calcéine encpasulée.

Une deuxième perspective concerne l'exploration de nouveaux cargos thérapeutiques compatibles avec cette technologique. Les travaux réalisés ici reposent sur l'encapsulation de deux petites molécules hydrophiles, la calcéine et le CNQX, dont les propriétés sont compatibles avec le protocole de formulation utilisé. L'adaptation du système à d'autres molécules d'intérêt nécessitera d'évaluer leur compatibilité avec le protocole émulsion-centrifugation, leur capacité à être encapsulées en quantité suffisante ainsi que leur maintien d'activité après photolibération. Cette évolution présente un intérêt particulier dans le contexte du système nerveux central, où de nombreuses molécules présentant un potentiel thérapeutique, notamment des peptides, des protéines ou des acides nucléiques, restent difficiles à administrer en raison de leur faible capacité à franchir la BHE (Gosselet et al. 2021;

William M. Pardridge 2005). Les polymersomes constituent une approche prometteuse pour la délivrance de ce type de cargos, plusieurs études ayant démontré leur capacité générale à encapsuler et transporter des biomacromolécules thérapeutiques (Iqbal et al. 2020). Les polymersomes pourraient même être utilisés pour encapsuler des vésicules extracellulaires, qui s'intègreraient dans les cellules pour libérer leur contenu une fois les polymersomes photoactivés. L'adaptation de ces stratégies au système développé dans cette thèse nécessitera toutefois de déterminser si ces cargos peuvent être intégrés au protocole d'émulsion-centrifugation tout en conservant les propriétés essentielles de photoactivation et de pholibération des polymersomes.

Enfin, une évolution importante pourrait concerner le développement de nouveaux fluorophores photosensibles afin de dépasser certaines limites associées à l'utilisation de la lumière visible. Le système développé dans cette thèse repose sur une activation efficace dans le domaine visible, adaptée aux expériences réalisées en solution et sur tranches cérébrales. Cependant, l'utilisation de longueurs d'onde visibles limite la profondeur d'activation possible dans le cerveau en raison de leur absorption et de leur diffusion. Le développement de fluorophores activables dans le proche infrarouge (NIR) pourrait ainsi améliorer les possibilités d'activation dans des tissus plus profonds, sous réserve de conserver une efficacité de photolibération compatible avec des contraintes biologiques du tissu cérébral. Des stratégies reposant sur l'absorption biphotonique pourraient également permettre de bénéficier d'une meilleure pénétration tissulaire tout en conservant une activation lumineuse efficace (Denk, Strickler, and Webb 1990; Helmchen and Denk 2005). Tout comme pour l'optogénétique, le développement de nouveaux fluorophores avec une meilleure biocompatibilité avec ces approches représente ainsi une perspective importante pour les futures générations de polymersomes photoactivables.

4.2. VALIDATION *IN VIVO*

Une étape essentielle pour poursuivre le développement de cette technologie consistera à valider son fonctionnement dans des modèles *in vivo*. Les résultats obtenus dans cette thèse démontrent la capacité des polymersomes photoactivables à induire une photolibération fonctionnelle dans des tranches cérébrales, mais plusieurs paramètres

restent à caractériser après administration dans un organisme vivant, notamment leur devenir, leur tolérance et leur capacité à moduler l'activité neuronale *in vivo.*

Un premier enjeu concernera le devenir des polymersomes après administration intracérébrale. Dans la stratégie développée ici, les polymersomes sont destinés à être administrés localement au sein du tissu cérébral, sans nécessiter de franchissement de la BHE pour atteindre leur site d'action. Il sera donc essentiel de caractériser leur persistance dans le tissu cérébral, leur éventuelle dégradation ainsi que l'élimination des produits issus de leur désassemblage. La possibilité d'un passage à travers la BHE de polymersomes intacts ou ayant subi une photostimulation sera évalué à l'aide d'un modèle humain de BHE. Une collaboration a été initiée avec le Professeur Fabien Gosselet du laboratoire LBHE (Laboratoire de la Barrière-Hémato Encéphalique, UR2465, Université d'Artois, France), spécialiste de la modélisation *in vitro* de la BHE à partir de cellules endothéliales cérébrales humaines (Cecchelli et al. 2014; Dehouck et al. 2022). Les polymersomes seront appliqués de part et d'autre du modèle afin de quantifier leur passage entre les différents compartiments ainsi que leur éventuelle accumulation dans les cellules endothéliales. Le suivi de la fluorescence de la cyanine 5.5 intégrée aux polymersomes permettra également d'étudier leur persistance et leur élimination. Par ailleurs, l'impact potentiel des formulations sur l'intégrité fonctionnelle de la BHE pourra être évalué par des mesures de résistance électrique transendothéliale (TEER) et de perméabilité paracellulaire, selon les méthodologies développées par cette équipe.

Une deuxième étape consistera à transposer la photolibération démontrée sur tranches cérébrales vers l'animal vivant. Dans un premier temps, cette validation pourra être réalisée chez la souris anesthésiée en utilisant des polymersomes chargés en calcéine et CNQX. Ils seront injectés localement dans l'hippocampe et l'impact fonctionnel de la photolibération du CNQX sur l'activité du circuit CA3-CA1 sera évalué par des enregistrements électrophysiologiques, selon une approche directement inspirée des expériences réalisées sur tranches cérébrales. Cette étape permettra de déterminer si la photolibération du CNQX reste efficace dans un tissu cérébral intact et si elle permet de moduler l'activité neuronale *in vivo.* Une collaboration a déjà été initiée avec le Centre d'Imagerie de Bordeaux (BIC), dont les équipements d'imagerie et d'enregistrement *in vivo* permettront la mise en œuvre de ces expériences.

Ensuite, cette approche pourra être étendue à des animaux libres de leurs mouvements grâce à l'utilisation d'implants chroniques combinant administration locale de polymersomes, stimulation lumineuse et enregistrement de l'activité neuronale (Y. Zhang et al. 2019). Les polymersomes pourront être administrés directement au niveau de la région cérébrale ciblée à l'aide d'une canule implantée, tandis que la photolibération sera déclenchée à la demande par stimulation lumineuse. L'activité des neurones situés à proximité du site de photolibération pourra alors être suivie simultanément afin d'évaluer l'impact fonctionnel de la libération contrôlée du composé d'intérêt. Cette approche permettrait d'étudier l'efficacité du système dans des conditions physiologiques plus complexes et d'explorer son potentiel comme outil de modulation spatio-temporelle de l'activité de l'activité neuronale. Différentes stratégies d'illumination pourront être envisagées afin d'optimiser la photostimulation *in vivo*, notamment à l'aide de fibres optiques implantées ou de systèmes miniaturisés adaptés aux animaux libres de leurs mouvements. Parmis ces approches, les mini-endoscopes permettraient de combiner stimulation lumineuse et enregistrement de l'activité neuronale chez l'animal en libre déplacement (Stamatakis et al. 2018; J. Zhang et al. 2023). Pour cela, des collaborations avec Dr Lisa Roux (IINS, Bordeaux neurocampus) et Dr Nicolas Mallet (IMN, Bordeaux Neurocampus) dont les expertises et les équipements disponibles permettront la mise en œuvre de ces expériences sont actuellement à l'étude.

4.3. APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

La conception des polymersomes photoactivables développés dans cette thèse repose sur une approche de plateforme, dont les applications potentielles peuvent être adaptées en fonction de la pathologie ciblée et de la nature du composé encapsulé. La possibilité de modifier le cargo délivré, les propriétés de formulation ainsi que les paramètres d'activation lumineuse confère à cette technologie une certaine versatilité, permettant d'envisager son utilisation dans différents contextes biologiques nécessitant une délivrance locale et contrôlée de molécules actives. En premier lieu, il est attendu que ces polymersomes photoactivables soient utilisés en recherche fondamentale et préclinique. Si on fait encore le parallèle avec l'optogénétique, c'est son utilisation expontentielle en recherche fondamentale qui a permis de l'optimiser et de diversifier les outils connexes, permettant aujourd'hui d'envisager son

utilisation à des fins thérapeutiques. En ce sens, les polymersomes photoactivables pourraient être utilisés pour répondre à de nombreuses questions en neurosciences, en permettant la libération contrôlée de composés qui sont difficile à manipuler autrement.

Parmi les applications potentielles de cette approche, l'étude et la modulation des interactions pathologiques entre les neurones et les cellules tumorales dans le glioblastome constituent une perspective particulièrement intéressante (Winkler et al. 2023). Cette application s'inscrit dans la continuité directe du projet développé au cours de cette thèse et sera explorée dans le cadre d'un projet doctoral dédié actuellement financé. Le glioblastome constitue en effet une tumeur cérébrale particulièrement agressive, associée à un pronostic défavorable malgré les stratégies thérapeutiques actuellement disponibles. Au cours des dernières années, plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence d'interactions fonctionnelles étroites entre les cellules de glioblastome et les réseaux neuronaux environnants, suggérant que l'activité neuronale participe directement à la progression tumorale. Parmi ces mécanismes, la formation de synapses dites « malignes » entre les neurones et les cellules tumorales constitue l'une des découvertes les plus marquantes (Venkataramani et al. 2019, 2022). Ces synapses permettent aux cellules de glioblastome de recevoir directement des signaux glutamatergiques via des récepteurs AMPA perméables au calcium (**Figure 73**) (Venkataramani et al. 2019). Il a été montré que cette communication neuronale favorise la prolifération, l'invasion et la progression tumorale, tandis que l'inhibition pharmacologique des récepteurs AMPA réduit significativement ces phénomènes.

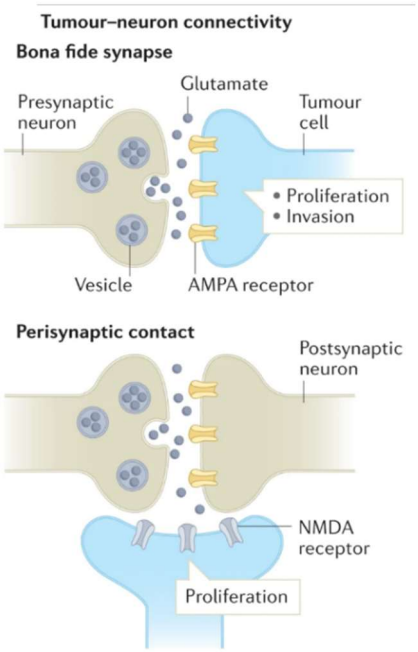


Figure 73. Interactions neuronales impliquées dans la progression du glioblastome.
Les cellules tumorales peuvent établir des connexions synaptiques directes avec les neurones ou se positionner à proximité des synapses neuronales, leur permettant de détecter le glutamate libéré dans l'environnement extracellulaire. L'activation des récepteurs glutamatergiques, notamment des récepteurs AMPA participe à la progression tumorale. *Adapté de Venkataramani et al. (2022).*

Dans ce contexte, les polymersomes photoactivables développés dans cette thèse pourraient constituer un outil permettant de moduler localement ces interactions neuronales pathologiques. La démonstration de la photolibération contrôlée du CNQX réalisée au cours de ce travail représente une première étape particulièrement pertinente, puisque cette molécule agit précisément sur les récepteurs AMPA impliqués dans les synapses malignes.

Afin d'explorer cette hypothèse, une première étape consistera à développer des modèles expérimentaux permettant de reproduire les interactions entre les cellules de glioblastome et les réseaux neuronaux. Parmi les approches envisagées, les modèles tridimensionnels de neurosphères apparaissent particulièrement intéressants (Chauvineau et al. 2026), car ils permettent de conserver une organisation cellulaire plus proche de celle observée *in vivo* tout en restant compatibles avec des analyses fonctionnelles, structurelles et moléculaires de haute précision. L'introduction de cellules de glioblastome au sein de ces réseaux neuronaux permettra de modéliser certaines caractéristiques décrites dans la littérature, notamment l'intégration des cellules tumorales dans les circuits neuronaux et leur capacité à exploiter l'activité neuronale environnante pour favoriser leur progression.

Ces modèles constitueront un support particulièrement adapté pour étudier les mécanismes impliqués dans la formation des synapses malignes entre neurones et cellules tumorales. Bien que l'existence de ces connexions fonctionnelles soit désormais bien établie, les étapes cellulaires et moléculaires conduisant à leur mise en place demeurent encore incomplètement comprises. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans l'établissement ou le maintien de ces interactions pathologiques.

Dans ce contexte, les polymersomes photoactivables pourraient constituer un outil permettant d'intervenir de manière contrôlée au cours de différentes étapes de ce processus. La libération locale d'antagonistes des récepteurs AMPA, tels que le CNQX, pourrait notamment être utilisée pour étudier l'impact d'une inhibition spatio-temporelle de cette communication neuronale sur l'activité des cellules tumorales et leur capacité d'invasion (Venkataramani et al. 2019). De plus, les polymersomes pourraient être utilisés pour encapsuler d'autres molécules, voire des cocktails de molécules pour contrer au mieux la propagation des cellules tumorales dans le tissu neuronal. A plus long terme, les polymersomes photoactivables pourraient venir renforcer l'arsenal thérapeutique pour empêcher la progression du glioblastome.

4.4. POTENTIALITES FUTURES DES POLYMERSOMES PHOTOACTIVABLES

En conclusion, ce travail de thèse a permis la mise au point d'un système photoactivable destiné à libérer des molécules dans le cerveau de manière contrôlée dans le temps et l'espace. Si nous nous projetons à plus long terme, nous pouvons espérer que ce premier système ne soit que la version V0 d'une technologie appelée à se développer et à se diversifier pour répondre aux besoins de la recherche fondamentale et préclinique, mais également à ceux du développement de nouvelles approches thérapeutiques pour les maladies du cerveau d'origine localisée. Les possibilités d'évolution de cette technologie sont nombreuses (**Figure 74**).

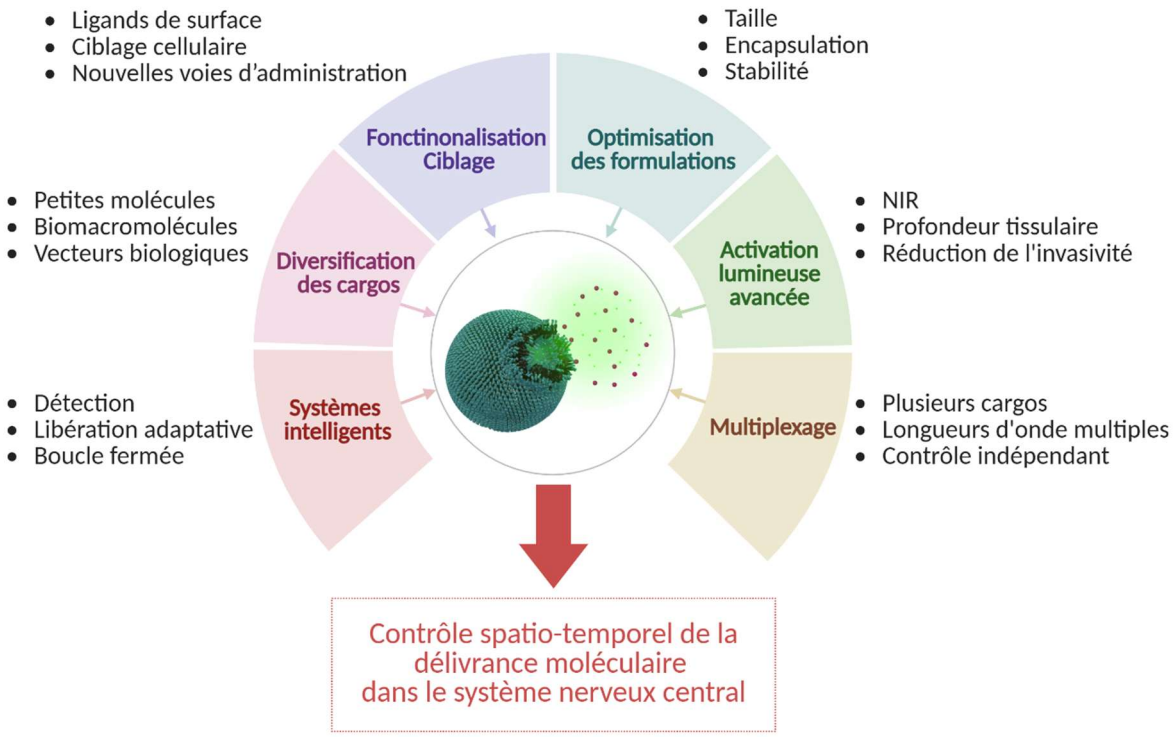


Figure 74. Perspectives d'évolution des polymersomes photoactivables pour la délivrance contrôlée de molécules dans le système nerveux central.
Réalisée sur Biorender.com.

L'amélioration du contrôle des propriétés physicochimiques des polymersomes pourrait notamment permettre de produire des formulations dont la taille serait ajustable selon l'application visée, tout en conservant les mécanismes de photoactivation développés dans cette thèse.

Le développement de nouveaux fluorophores photosensibles activables à des longueurs d'onde plus pénétrantes, notamment dans le proche infrarouge, pourrait également réduire l'invasivité des dispositifs lumineux nécessaires à leur utilisation.

Une évolution particulièrement intéressante pourrait également résider dans le développement de stratégies de multiplexage. Des populations distinctes de polymersomes contenant différents fluorophores photosensibles pourraient être conçues afin de répondre sélectivement à des longueurs d'onde spécifiques. Il deviendrait alors possible d'administrer simultanément plusieurs formulations au sein d'un même tissu et de déclencher indépendamment la libération de différents composés par l'application de stimulations lumineuses adaptées. Une telle approche offrirait un niveau supplémentaire de contrôle

spatio-temporel et permettrait d'envisager la modulation séquentielle ou combinée de plusieurs voies biologiques au sein d'une même région cérébrale.

L'élargissement de la nature des cargos transportés constitue une autre perspective majeure. Au-delà des petites molécules utilisées dans ce travail, les polymersomes pourraient permettre la délivrance contrôlée de biomacromolécules telles que des peptides, des protéines, des acides nucléiques, des vecteurs viraux, des enzymes, des anticorps ou encore des vésicules extracellulaires. Ces approches offriraient de nouvelles possibilités pour l'étude et la modulation de mécanismes biologiques complexes au sein du système nerveux central.

La fonctionnalisation de la surface des polymersomes pourrait également favoriser leur ciblage vers certaines populations cellulaires ou faciliter leur passage à travers certaines interfaces biologiques du système nerveux central. Bien que le système développé dans cette thèse repose sur une administration intracérébrale locale, l'ajout de ligands de ciblage pourrait, à terme, permettre d'exploiter certaines régions plus perméables de la BHE ou des interfaces spécialiées telles que l'épithélium olfactif, ouvrant ainsi la voie à des modalités d'adminsitration moins invasives.

Enfin, l'intégration de polymersomes photoactivables dans des dispositifs en boucle fermée représente une perspective particulièrement ambitieuse. Dans une telle configuration, la détection en temps réel d'un biomarqueur physiologique, moléculaire ou électrophysiologique pourrait déclencher automatiquement la stimulation lumineuse et la libération du composé encpasulé. Une telle approche permettrait d'envisager des systèmes capables d'adapter dynamiquement leur action en fonction de l'état du tissu cérébral.

Ainsi, les polymersomes photoactivables développés dans cette thèse constituent une première étape vers une technologie dont les possibilités demeurent encore largement à explorer. Les progrès conjoints de la chimie, de la physique, de l'injégnierie biomédicale, des neurosciences et des sciences du numérique devraient contribuer à enrichir progressivement ces systèmes et à étendre leur champ d'application, tant pour la recherche que pour le développement de futures stratégie thérapeutique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott, N. Joan, Adjanie A. K. Patabendige, Diana E. M. Dolman, Siti R. Yusof, and David J. Begley. 2010. 'Structure and Function of the Blood–Brain Barrier'. *Neurobiology of Disease* 37(1): 13–25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030.

Ahmed, H. Shafeeq. 2025. 'The Multifaceted Role of L-Type Amino Acid Transporter 1 at the Blood–Brain Barrier: Structural Implications and Therapeutic Potential'. *Molecular Neurobiology* 62(3): 3813–32. doi:10.1007/s12035-024-04506-9.

Ait Ouares, Karima, Corinne Beurrier, Marco Canepari, Gwenaelle Laverne, and Nicola Kuczewski. 2019. 'Opto Nongenetics Inhibition of Neuronal Firing'. *The European Journal of Neuroscience* 49(1): 6–26. doi:10.1111/ejn.14251.

Alabrahim, Obaydah Abd Alkader, and Hassan Mohamed El-Said Azzazy. 2022. 'Polymeric Nanoparticles for Dopamine and Levodopa Replacement in Parkinson's Disease'. *Nanoscale Advances* 4(24): 5233–44. doi:10.1039/D2NA00524G.

Allen, Theresa M., and Pieter R. Cullis. 2013. 'Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications'. *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/j.addr.2012.09.037.

Aubertin, Kelly, Max Piffoux, Anna Sebbagh, Jeanne Gauthier, Amanda K. A. Silva, and Florence Gazeau. 2021. 'Applications thérapeutiques des vésicules extracellulaires'. *médecine/sciences* 37(12): 1146–57. doi:10.1051/medsci/2021207.

Bae, William Han, Stefania Maraka, and Ahmad Daher. 2024. 'Challenges and Advances in Glioblastoma Targeted Therapy: The Promise of Drug Repurposing and Biomarker Exploration'. *Frontiers in Oncology* 14. doi:10.3389/fonc.2024.1441460.

Bagal, Sharan, and Peter Bungay. 2014. 'Restricting CNS Penetration of Drugs to Minimise Adverse Events: Role of Drug Transporters'. *Drug Discovery Today: Technologies* 12: e79–85. doi:10.1016/j.ddtec.2014.03.008.

Banerjee, Amrita, Jianping Qi, Rohan Gogoi, Jessica Wong, and Al Et. 2016. 'Role of Nanoparticle Size, Shape and Surface Chemistry in Oral Drug Delivery'. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2016.07.051.

Barenholz, Yechezkel (Chezy). 2012. 'Doxil® — The First FDA-Approved Nano-Drug: Lessons Learned'. *Journal of Controlled Release* 160(2): 117–34. doi:10.1016/j.jconrel.2012.03.020.

Barolet, Daniel. 2008. 'Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology'. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. doi:10.1016/j.sder.2008.08.003.

Bastiancich, C., E. Bozzato, I. Henley, and B. Newland. 2021. 'Does Local Drug Delivery Still Hold Therapeutic Promise for Brain Cancer? A Systematic Review'. *Journal of Controlled Release* 337: 296–305. doi:10.1016/j.jconrel.2021.07.031.

Bates, Frank S., and Glenn H. Fredrickson. 1999. 'Block Copolymers—Designer Soft Materials'. *Physics Today*. doi:10.1063/1.882522.

Bear, Mark F., Michael A. Paradiso, and Barry W. Connors. 2001. 'Neuroscience: Exploring the Brain'.

Beauté, Louis, Nathan McClenaghan, and Sébastien Lecommandoux. 2019. 'Photo-Triggered Polymer Nanomedicines: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Applications'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 138: 148–66. doi:10.1016/j.addr.2018.12.010.

Behzadi, Shahed, Vahid Serpooshan, Wei Tao, Majd A. Hamaly, Mahmoud Y. Alkawareek, Erik C. Dreaden, Dennis Brown, et al. 2017. 'Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey inside the Cell'. *Chemical Society Reviews* 46(14): 4218–44. doi:10.1039/C6CS00636A.

Benabid, Alim Louis. 2003. 'Deep Brain Stimulation for Parkinson's Disease'. *Current Opinion in Neurobiology*. doi:10.1016/j.conb.2003.11.001.

Bergey, Gregory K., Martha J. Morrell, Eli M. Mizrahi, Alica Goldman, David King-Stephens, Dileep Nair, Shraddha Srinivasan, et al. 2015. 'Long-Term Treatment with Responsive Brain Stimulation in Adults with Refractory Partial Seizures'. *Neurology* 84(8): 810–17. doi:10.1212/WNL.0000000000001280.

Blanazs, Adam, Steven P. Armes, and Anthony J. Ryan. 2009. 'Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and Their Biological Applications'. *Macromolecular Rapid Communications*. doi:10.1002/marc.200800713.

Blanco, Elvin, Haifa Shen, and Mauro Ferrari. 2015. 'Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery'. *Nature Biotechnology* 33(9): 941–51. doi:10.1038/nbt.3330.

Blumenfeld, Zack, and Helen Brontë-Stewart. 2015. 'High Frequency Deep Brain Stimulation and Neural Rhythms in Parkinson's Disease'. *Neuropsychology Review*. doi:10.1007/s11065-015-9308-7.

Boireau, Wilfrid, and Céline Elie-Caille. 2021. 'Les vésicules extracellulaires - Définition, séparation, caractérisation'. *médecine/sciences* 37(12): 1092–1100. doi:10.1051/medsci/2021201.

Bröhl, Timo, Thorsten Rings, Jan Pukropski, Randi von Wrede, and Klaus Lehnertz. 2024. 'The Time-Evolving Epileptic Brain Network: Concepts, Definitions, Accomplishments, Perspectives'. *Frontiers in Network Physiology* 3. doi:10.3389/fnetp.2023.1338864.

Buzsáki, György, Costas A. Anastassiou, and Christof Koch. 2012. 'The Origin of Extracellular Fields and Currents — EEG, ECoG, LFP and Spikes'. *Nature Reviews Neuroscience* 13(6): 407–20. doi:10.1038/nrn3241.

Cecchelli, Romeo, Sezin Aday, Emmanuel Sevin, Catarina Almeida, Maxime Culot, Lucie Dehouck, Caroline Coisne, et al. 2014. 'A Stable and Reproducible Human Blood-Brain Barrier Model Derived from Hematopoietic Stem Cells'. *PLoS ONE* 9(6): e99733. doi:10.1371/journal.pone.0099733.

'Cerebral Therapeutics Announces Enrollment of First Patient in a Multicenter Randomized Controlled Phase 2b Trial in Epilepsy'. 2020. https://www.businesswire.com/news/home/20201117005162/en/Cerebral-Therapeutics-Announces-Enrollment-of-First-Patient-in-a-Multicenter-Randomized-Controlled-Phase-2b-Trial-in-Epilepsy (June 29, 2026).

Cerritelli, Simona, Diana Velluto, and Jeffrey A. Hubbell. 2007. 'PEG-SS-PPS: Reduction-Sensitive Disulfide Block Copolymer Vesicles for Intracellular Drug Delivery'. *Biomacromolecules* 8(6): 1966–72. doi:10.1021/bm070085x.

Chauvineau, Benjamin, Adèle Drouet, Charles Ducrot, Léa Bonamy, Tiffany Cloatre, Louis Hurson, Jérôme Baufreton, Jean-Baptiste Sibarita, and Olivier Thoumine. 2026. 'Neurospheres from

Primary Rodent Brain Cells to Probe the 3D Organization and Function of Synapses'. : 2026.03.19.712855. doi:10.64898/2026.03.19.712855.

Choi, Bryan D., Elizabeth R. Gerstner, Matthew J. Frigault, Mark B. Leick, Christopher W. Mount, Leonora Balaj, Sarah Nikiforow, et al. 2024. 'Intraventricular CARv3-TEAM-E T Cells in Recurrent Glioblastoma'. *New England Journal of Medicine* 390(14): 1290–98. doi:10.1056/NEJMoa2314390.

Chorghay, Zahraa, Ragnhildur Thóra Káradóttir, and Edward S. Ruthazer. 2018. 'White Matter Plasticity Keeps the Brain in Tune: Axons Conduct While Glia Wrap'. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12: 428. doi:10.3389/fncel.2018.00428.

Cook, Mark, Michael Murphy, Kristian Bulluss, Wendyl D'Souza, Chris Plummer, Emma Priest, Catherine Williams, et al. 2020. 'Anti-Seizure Therapy with a Long-Term, Implanted Intra-Cerebroventricular Delivery System for Drug-Resistant Epilepsy: A First-in-Man Study'. *eClinicalMedicine* 22. doi:10.1016/j.eclinm.2020.100326.

Crowell, Andrea L., Patricio Riva-Posse, Paul E. Holtzheimer, Steven J. Garlow, Mary E. Kelley, Robert E. Gross, Lydia Denison, Sinead Quinn, and Helen S. Mayberg. 2019. 'Long-Term Outcomes of Subcallosal Cingulate Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression'. *American Journal of Psychiatry* 176: 949–56. doi:10.1176/appi.ajp.2019.18121427.

Dalkilic, Evren Burakgazi. 2017. 'Neurostimulation Devices Used in Treatment of Epilepsy'. *Current Treatment Options in Neurology*. doi:10.1007/s11940-017-0442-9.

D'Amico, Randy S., Manish K. Aghi, Michael A. Vogelbaum, and Jeffrey N. Bruce. 2021. 'Convection-enhanced Drug Delivery for Glioblastoma: A Review'. *Journal of neuro-oncology* 151(3): 415–27. doi:10.1007/s11060-020-03408-9.

Davis, Jane S. 2023. 'Pharmacy Through the Ages'. *Physician Assistant Clinics* 8(2): 237–41. doi:10.1016/j.cpha.2022.10.004.

Dehouck, Marie-Pierre, Masanori Tachikawa, Yutaro Hoshi, Kotaro Omori, Claude-Alain Maurage, Guillaume Strecker, Lucie Dehouck, et al. 2022. 'Quantitative Targeted Absolute Proteomics for Better Characterization of an In Vitro Human Blood–Brain Barrier Model Derived from Hematopoietic Stem Cells'. *Cells* 11(24): 3963. doi:10.3390/cells11243963.

Delbeke, Jean, Luis Hoffman, Katrien Mols, Dries Braeken, and Dimiter Prodanov. 2017. 'And Then There Was Light: Perspectives of Optogenetics for Deep Brain Stimulation and Neuromodulation'. *Frontiers in Neuroscience* 11. doi:10.3389/fnins.2017.00663.

Denk, Winfried, James H. Strickler, and Watt W. Webb. 1990. 'Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy'. *Science* 248(4951): 73–76. doi:10.1126/science.2321027.

Discher, Bohdana M., You-Yeon Won, David S. Ege, James C.-M. Lee, and Al Et. 1999. 'Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers'. *Science*. doi:10.1126/science.284.5417.1143.

Discher, Dennis E., and Fariyal Ahmed. 2006. 'Polymersomes'. *Annual Review of Biomedical Engineering* 8(1): 323–41. doi:10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095838.

Discher, Dennis E., and Adi Eisenberg. 2002. 'Polymer Vesicles'. *Science* 297(5583): 967–73. doi:10.1126/science.1074972.

Doi, Daisuke, Hiroaki Magotani, Tetsuhiro Kikuchi, Megumi Ikeda, Satoe Hiramatsu, Kenji Yoshida, Naoki Amano, et al. 2020. 'Pre-Clinical Study of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Progenitor Cells for Parkinson's Disease'. *Nature Communications* 11(1): 3369. doi:10.1038/s41467-020-17165-w.

Dong, Xiaowei. 2018. 'Current Strategies for Brain Drug Delivery'. *Theranostics* 8(6): 1481–93. doi:10.7150/thno.21254.

Drobisz, Dominik, and Alena Damborská. 2019. 'Deep Brain Stimulation Targets for Treating Depression'. *Behavioural Brain Research* 359: 266–73. doi:10.1016/j.bbr.2018.11.004.

Droguerre, Marine, Sébastien Brot, Clément Vitrac, Marianne Benoit-Marand, Laure Belnoue, Maelig Patrigeon, Anaïs Lainé, et al. 2022. 'Better Outcomes with Intranigral versus Intrastriatal Cell Transplantation: Relevance for Parkinson's Disease'. *Cells* 11(7): 1191. doi:10.3390/cells11071191.

Duncan, John S., Josemir W. Sander, Sanjay M. Sisodiya, and Matthew C. Walker. 2006. 'Adult Epilepsy'. *The Lancet* 367(9516): 1087–1100. doi:10.1016/S0140-6736(06)68477-8.

Duncan, Ruth, and Rogerio Gaspar. 2011. 'Nanomedicine(s) under the Microscope'. *Molecular Pharmaceutics* 8(6): 2101–41. doi:10.1021/mp200394t.

Equy, Eloise, Emmanuel Ibarboure, Eric Grelet, and Sébastien Lecommandoux. 2025. 'Janus Polymeric Giant Vesicles on Demand: A Predictive Phase Separation Approach for Efficient Formation'. *Journal of the American Chemical Society* 147(11): 9727–38. doi:10.1021/jacs.4c18003.

Fan, Qianyi, Yuanyuan Liu, Guanhong Cui, Zhiyuan Zhong, and Chao Deng. 2021. 'Brain Delivery of Plk1 Inhibitor via Chimaeric Polypeptide Polymersomes for Safe and Superb Treatment of Orthotopic Glioblastoma'. *Journal of Controlled Release* 329: 1139–49. doi:10.1016/j.jconrel.2020.10.043.

Farokhzad, Omid C., and Robert Langer. 2009. 'Impact of Nanotechnology on Drug Delivery'. *ACS Nano*. doi:10.1021/nn900002m.

Fenno, Lief, Ofer Yizhar, and Karl Deisseroth. 2011. 'The Development and Application of Optogenetics'. *Annual review of neuroscience* 34: 389–412. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113817.

Ferreira, Raquel, Joseph Napoli, Tariq Enver, Liliana Bernardino, and Lino Ferreira. 2020. 'Advances and Challenges in Retinoid Delivery Systems in Regenerative and Therapeutic Medicine'. *Nature Communications* 11(1): 4265. doi:10.1038/s41467-020-18042-2.

Frenkel, Nicola, Susanna Poghosyan, Jan Willem van Wijnbergen, Lotte van den Bent, Liza Wijler, André Verheem, Inne Borel Rinkes, Onno Kranenburg, and Jeroen Hagendoorn. 2023. 'Tissue Clearing and Immunostaining to Visualize the Spatial Organization of Vasculature and Tumor Cells in Mouse Liver'. *Frontiers in Oncology* 13. doi:10.3389/fonc.2023.1062926.

Friedman, Henry S., Tracy Kerby, and Hilary Calvert. 2000. 'Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma'. *Clinical Cancer Research* 6(7): 2585–97.

Fuchter, Matthew J. 2020. 'On the Promise of Photopharmacology Using Photoswitches: A Medicinal Chemist's Perspective'. *Journal of Medicinal Chemistry*. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00629.

Gampa, Gautham, Rahul Vadlakonda, Eric Stefanich, Amrita V. Kamath, Shraddha Sadekar, and Vittal Shivva. 2026. 'Bridging the Blood-Brain Barrier: Strategies to Improve Delivery of Biologics to Tumors in the Brain'. *Fluids and Barriers of the CNS* 23: 25. doi:10.1186/s12987-026-00760-2.

Ganesan, Palanivel, Prakash Ramalingam, Govindarajan Karthivashan, Young Tag Ko, and Dong-Kug Choi. 2018. 'Recent Developments in Solid Lipid Nanoparticle and Surface-Modified Solid Lipid Nanoparticle Delivery Systems for Oral Delivery of Phyto-Bioactive Compounds in Various Chronic Diseases'. *International Journal of Nanomedicine* 13: 1569–83. doi:10.2147/IJN.S155593.

Garcia-Garcia, E., K. Andrieux, S. Gil, and P. Couvreur. 2005. 'Colloidal Carriers and Blood–Brain Barrier (BBB) Translocation: A Way to Deliver Drugs to the Brain?' *International Journal of Pharmaceutics* 298(2): 274–92. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.03.031.

Gernert, Manuela, and Malte Feja. 2020a. 'Bypassing the Blood–Brain Barrier: Direct Intracranial Drug Delivery in Epilepsies'. *Pharmaceutics* 12(12): 1134. doi:10.3390/pharmaceutics12121134.

Gernert, Manuela, and Malte Feja. 2020b. 'Bypassing the Blood-Brain Barrier: Direct Intracranial Drug Delivery in Epilepsies'. *Pharmaceutics* 12(12): 1134. doi:10.3390/pharmaceutics12121134.

Ghellab, Salah Eddine, Wei Mu, Qingchuang Li, and Xiaojun Han. 2019. 'Prediction of the Size of Electroformed Giant Unilamellar Vesicle Using Response Surface Methodology'. *Biophysical Chemistry* 253: 106217. doi:10.1016/j.bpc.2019.106217.

'Global Status Report on Neurology: Executive Summary'. 2025. https://www.who.int/publications/i/item/B09657 (May 11, 2026).

Gong, Liang, Xiuzhi Shan, Xu-Hua Zhao, Li Tang, and Xiao-Bing Zhang. 2021. 'Activatable NIR-II Fluorescent Probes Applied in Biomedicine: Progress and Perspectives'. *ChemMedChem* 16(16): 2426–40. doi:10.1002/cmdc.202100142.

Gosselet, Fabien, Rodrigo Azevedo Loiola, Anna Roig, Anna Rosell, and Maxime Culot. 2021. 'Central Nervous System Delivery of Molecules across the Blood-Brain Barrier'. *Neurochemistry International* 144: 104952. doi:10.1016/j.neuint.2020.104952.

Gradinaru, Viviana, Murtaza Mogri, Kimberly R. Thompson, Jaimie M. Henderson, and Karl Deisseroth. 2009. 'Optical Deconstruction of Parkinsonian Neural Circuitry'. *Science* 324(5925): 354–59. doi:10.1126/science.1167093.

Guo, Yuchen, Nan Li, Daiwei Zhang, Jingya Gu, Zhihuan Liao, Zihao Teng, Xiangfu Du, et al. 2025. 'Advancing Design Strategies in Smart Stimulus-Responsive Liposomes for Drug Release and Nanomedicine'. *BMEMat* n/a(n/a): e70045. doi:10.1002/bmm2.70045.

Gupta, Ankur, Nikolaos Vardalakis, and Fabien B. Wagner. 2023. 'Neuroprosthetics: From Sensorimotor to Cognitive Disorders'. *Communications Biology* 6(1): 14. doi:10.1038/s42003-022-04390-w.

Hadjidemetriou, Marilena, Zahraa Al-Ahmady, and Kostas Kostarelos. 2016. 'Time-Evolution of in Vivo Protein Corona onto Blood-Circulating PEGylated Liposomal Doxorubicin (DOXIL) Nanoparticles'. *Nanoscale*. doi:10.1039/c5nr09158f.

Hassan, Hani Mutlak A. 2015. 'A Short History of the Use of Plants as Medicines from Ancient Times'. *CHIMIA* 69(10): 622–622. doi:10.2533/chimia.2015.622.

Helmchen, Fritjof, and Winfried Denk. 2005. 'Deep Tissue Two-Photon Microscopy'. *Nature Methods* 2(12): 932–40. doi:10.1038/nmeth818.

Hernández Becerra, Elisa, Jennifer Quinchia, Cristina Castro, and Jahir Orozco. 2022. 'Light-Triggered Polymersome-Based Anticancer Therapeutics Delivery'. *Nanomaterials* 12(5): 836. doi:10.3390/nano12050836.

Holland, Katherine D. 2001. 'Efficacy, Pharmacology, and Adverse Effects of Antiepileptic Drugs'. *Neurologic Clinics*. doi:10.1016/s0733-8619(05)70021-9.

Horne, M. K., E. G. Butler, B. S. Gilligan, J. Wodak, R. J. Stark, and G. A. Brazenor. 1989. 'Intraventricular Infusion of Dopamine in Parkinson's Disease'. *Annals of Neurology* 26(6): 792–94. doi:10.1002/ana.410260620.

Hu, Xiuli, Yuqi Zhang, Zhigang Xie, Xiabin Jing, Adriano Bellotti, and Zhen Gu. 2017. 'Stimuli-Responsive Polymersomes for Biomedical Applications'. *Biomacromolecules* 18(3): 649–73. doi:10.1021/acs.biomac.6b01704.

Imunon. 2024. *A Phase III, Randomized, Double-Blinded, Dummy-Controlled Study of the Efficacy and Safety of ThermoDox® (Thermally Sensitive Liposomal Doxorubicin) in Combination With Radiofrequency Ablation (RFA) Compared to RFA-Alone in the Treatment of Non-Resectable Hepatocellular Carcinoma*. clinicaltrials.gov. Clinical trial registration. https://clinicaltrials.gov/study/NCT00617981 (May 27, 2026).

Iqbal, Shoaib, Mark Blenner, Angela Alexander-Bryant, and Jessica Larsen. 2020. 'Polymersomes for Therapeutic Delivery of Protein and Nucleic Acid Macromolecules: From Design to Therapeutic Applications'. *Biomacromolecules* 21(4): 1327–50. doi:10.1021/acs.biomac.9b01754.

Israelachvili, Jacob N., D. John Mitchell, and Barry W. Ninham. 1976. 'Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers'. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2*. doi:10.1039/F29767201525.

Itel, Fabian, Mohamed Chami, Adrian Najer, Samuel Lörcher, and Al Et. 2014. 'Molecular Organization and Dynamics in Polymersome Membranes: A Lateral Diffusion Study'. *Macromolecules*. doi:10.1021/ma5015403.

Iturrioz-Rodríguez, Nerea, Nicolas Sampron, and Ander Matheu. 2023. 'Current Advances in Temozolomide Encapsulation for the Enhancement of Glioblastoma Treatment'. *Theranostics* 13(9): 2734–56. doi:10.7150/thno.82005.

Iuchi, Toshihiko, Akihiro Inoue, Yuichi Hirose, Motohiro Morioka, Keishi Horiguchi, Atsushi Natsume, Yoshiki Arakawa, et al. 2022. 'Long-Term Effectiveness of Gliadel Implant for Malignant Glioma and Prognostic Factors for Survival: 3-Year Results of a Postmarketing Surveillance in Japan'. *Neuro-oncology Advances* 4(1): vdab189. doi:10.1093/noajnl/vdab189.

Iyer, Arun K., Greish Khaled, Jun Fang, and Hiroshi Maeda. 2006. 'Exploiting the Enhanced Permeability and Retention Effect for Tumor Targeting'. *Drug Discovery Today*. doi:10.1016/j.drudis.2006.07.005.

Jäkel, Sarah, and Leda Dimou. 2017. 'Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation'. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11. doi:10.3389/fncel.2017.00024.

Janjua, Taskeen Iqbal, Yuxue Cao, Aria Ahmed-Cox, Aun Raza, Md Moniruzzaman, Dewan Taslima Akhter, Nicholas L. Fletcher, et al. 2023. 'Efficient Delivery of Temozolomide Using Ultrasmall Large-Pore Silica Nanoparticles for Glioblastoma'. *Journal of Controlled Release* 357: 161–74. doi:10.1016/j.jconrel.2023.03.040.

Jankovic, Joseph. 2025. 'Parkinson Disease'. *Neurologic Clinics* 43(2): xiii–xv. doi:10.1016/j.ncl.2024.12.001.

Jaskiewicz, Karmena, Antje Larsen, Ingo Lieberwirth, Kaloian Koynov, Wolfgang Meier, George Fytas, Anja Kroeger, and Katharina Landfester. 2012. 'Probing Bioinspired Transport of Nanoparticles into Polymersomes'. *Angewandte Chemie International Edition* 51(19): 4613–17. doi:10.1002/anie.201108421.

Jenkins, Misty R., and Katharine J. Drummond. 2024. 'CAR T-Cell Therapy for Glioblastoma'. *New England Journal of Medicine* 390(14): 1329–32. doi:10.1056/NEJMe2401307.

Jeong, Jae-Woong, Jordan G. McCall, Gunchul Shin, Yihui Zhang, Ream Al-Hasani, Minku Kim, Shuo Li, et al. 2015. 'Wireless Optofluidic Systems for Programmable In Vivo Pharmacology and Optogenetics'. *Cell* 162(3): 662–74. doi:10.1016/j.cell.2015.06.058.

Jimenez-Mateos, Eva M., Tobias Engel, Paula Merino-Serrais, Ross C. McKiernan, Katsuhiro Tanaka, Genshin Mouri, Takanori Sano, et al. 2012. 'Silencing microRNA-134 Produces Neuroprotective and Prolonged Seizure-Suppressive Effects'. *Nature Medicine* 18(7): 1087–94. doi:10.1038/nm.2834.

Jung, Jua, In-Hyun Lee, Eunhye Lee, Jinho Park, and Sangyong Jon. 2007. 'pH-Sensitive Polymer Nanospheres for Use as a Potential Drug Delivery Vehicle'. *Biomacromolecules* 8(11): 3401–7. doi:10.1021/bm700517z.

Kalia, Lorraine V., and Anthony E. Lang. 2015. 'Parkinson's Disease'. *The Lancet* 386(9996): 896–912. doi:10.1016/S0140-6736(14)61393-3.

Kamaly, Nazila, Zeyu Xiao, Pedro M. Valencia, Aleksandar F. Radovic-Moreno, and Omid C. Farokhzad. 2012. 'Targeted Polymeric Therapeutic Nanoparticles: Design, Development and Clinical Translation'. *Chemical Society reviews* 41(7): 2971–3010. doi:10.1039/c2cs15344k.

Kankala, Ranjith Kumar, Ya-Hui Han, Jongbeom Na, Chia-Hung Lee, and Al Et. 2020. 'Nanoarchitectured Structure and Surface Biofunctionality of Mesoporous Silica Nanoparticles'. *Advanced Materials*. doi:10.1002/adma.201907035.

Kansız, Seyithan, and Yaşar Murat Elçin. 2023. 'Advanced Liposome and Polymersome-Based Drug Delivery Systems: Considerations for Physicochemical Properties, Targeting Strategies and Stimuli-Sensitive Approaches'. *Advances in Colloid and Interface Science* 317: 102930. doi:10.1016/j.cis.2023.102930.

Karthivashan, Govindarajan, Palanivel Ganesan, Shin-Young Park, Ho-Won Lee, and Dong-Kug Choi. 2020. 'Lipid-Based Nanodelivery Approaches for Dopamine-Replacement Therapies in Parkinson's Disease: From Preclinical to Translational Studies'. *Biomaterials* 232: 119704. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119704.

Kauscher, Ulrike, Margaret N. Holme, Mattias Björnmalm, and Molly M. Stevens. 2019. 'Physical Stimuli-Responsive Vesicles in Drug Delivery: Beyond Liposomes and Polymersomes'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 138: 259–75. doi:10.1016/j.addr.2018.10.012.

Kielbinski, Michal, and Joanna Bernacka. 2024. 'Fiber Photometry in Neuroscience Research: Principles, Applications, and Future Directions'. *Pharmacological Reports* 76(6): 1242–55. doi:10.1007/s43440-024-00646-w.

Kim, Sang-Soo, Antonina Rait, Eric Kim, James DeMarco, Kathleen F. Pirollo, and Esther H. Chang. 2015. 'Encapsulation of Temozolomide in a Tumor-Targeting Nanocomplex Enhances Anti-Cancer Efficacy and Reduces Toxicity in a Mouse Model of Glioblastoma'. *Cancer Letters* 369(1): 250–58. doi:10.1016/j.canlet.2015.08.022.

Kim, Shin-Hyun, Ho Cheung Shum, Jin Woong Kim, Jun-Cheol Cho, and David A. Weitz. 2011. 'Multiple Polymersomes for Programmed Release of Multiple Components'. *Journal of the American Chemical Society* 133(38): 15165–71. doi:10.1021/ja205687k.

Kim, Tae-il, Jordan G. McCall, Yei Hwan Jung, Xian Huang, and Al Et. 2013. 'Injectable, Cellular-Scale Optoelectronics with Applications for Wireless Optogenetics'. *Science*. doi:10.1126/science.1232437.

Kim, Younghoon, Manorama Tewari, J. David Pajerowski, Shenshen Cai, Shamik Sen, Jason Williams, Shashank Sirsi, Gordon Lutz, and Dennis E. Discher. 2009. 'Polymersome Delivery of siRNA and Antisense Oligonucleotides'. *Journal of Controlled Release* 134(2): 132–40. doi:10.1016/j.jconrel.2008.10.020.

Klán, Petr, Tomáš Šolomek, Christian G. Bochet, Aurélien Blanc, Richard Givens, Marina Rubina, Vladimir Popik, Alexey Kostikov, and Jakob Wirz. 2013. 'Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy'. *Chemical Reviews* 113(1): 119–91. doi:10.1021/cr300177k.

Klermund, Ludwig, Sarah T. Poschenrieder, and Kathrin Castiglione. 2017. 'Biocatalysis in Polymersomes: Improving Multienzyme Cascades with Incompatible Reaction Steps by Compartmentalization'. *ACS Catalysis*. doi:10.1021/acscatal.7b00776.

Kopac, Turkan. 2021. 'Protein Corona, Understanding the Nanoparticle–Protein Interactions and Future Perspectives: A Critical Review'. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.108.

Kralik, Jakub, Michiel van Wyk, Nino Stocker, and Sonja Kleinlogel. 2022. 'Bipolar Cell Targeted Optogenetic Gene Therapy Restores Parallel Retinal Signaling and High-Level Vision in the Degenerated Retina'. *Communications Biology* 5(1): 1116. doi:10.1038/s42003-022-04016-1.

Kreatsoulas, Daniel, Mark Damante, Santino Cua, and Russell R. Lonser. 2024. 'Adjuvant Convection-Enhanced Delivery for the Treatment of Brain Tumors'. *Journal of Neuro-Oncology* 166(2): 243–55. doi:10.1007/s11060-023-04552-8.

Królikowska, Aleksandra, and Maciej Tarnowski. 2025. 'CAR-T Cells Immunotherapy in the Treatment of Glioblastoma'. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII* 74(12): 363. doi:10.1007/s00262-025-04222-w.

Krook-Magnuson, Esther, Caren Armstrong, Mikko Oijala, and Ivan Soltesz. 2013. 'On-Demand Optogenetic Control of Spontaneous Seizures in Temporal Lobe Epilepsy'. *Nature Communications* 4(1): 1376. doi:10.1038/ncomms2376.

Kwan, Patrick, and Martin J. Brodie. 2000. 'Early Identification of Refractory Epilepsy'. *New England Journal of Medicine* 342(5): 314–19. doi:10.1056/NEJM200002033420503.

Lacour, Stéphanie P., Grégoire Courtine, and Jochen Guck. 2016. 'Materials and Technologies for Soft Implantable Neuroprostheses'. *Nature Reviews Materials*. doi:10.1038/natrevmats.2016.63.

Lam, Fred C., Stephen W. Morton, Jeffrey Wyckoff, Tu-Lan Vu Han, Mun Kyung Hwang, Amanda Maffa, Elena Balkanska-Sinclair, et al. 2018. 'Enhanced Efficacy of Combined Temozolomide and Bromodomain Inhibitor Therapy for Gliomas Using Targeted Nanoparticles'. *Nature Communications* 9(1): 1991. doi:10.1038/s41467-018-04315-4.

Lammers, Twan. 2024. 'Nanomedicine Tumor Targeting'. *Advanced Materials* 36(26): 2312169. doi:10.1002/adma.202312169.

LaVan, David A., Terry McGuire, and Robert Langer. 2003. 'Small-Scale Systems for in Vivo Drug Delivery'. *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/nbt876.

Le Meins, J. -F., O. Sandre, and S. Lecommandoux. 2011. 'Recent Trends in the Tuning of Polymersomes' Membrane Properties'. *The European Physical Journal E* 34(2): 14. doi:10.1140/epje/i2011-11014-y.

Lebedev, Mikhail A., and Miguel A. L. Nicolelis. 2017. 'Brain-Machine Interfaces: From Basic Science to Neuroprostheses and Neurorehabilitation'. *Physiological Reviews*. doi:10.1152/physrev.00027.2016.

Ledri, Marco, and Merab Kokaia. 2026. 'Gene Therapy for Epilepsy: An Emerging, Promising Approach for a Serious Neurological Disorder'. *Journal of Internal Medicine* 299(3): 302–27. doi:10.1111/joim.70059.

Lee, Jung Seok, and Jan Feijen. 2012. 'Polymersomes for Drug Delivery: Design, Formation and Characterization'. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2011.10.005.

Lee, Jung Seok, Wei Zhou, Fenghua Meng, Dianwen Zhang, Cees Otto, and Jan Feijen. 2010. 'Thermosensitive Hydrogel-Containing Polymersomes for Controlled Drug Delivery'. *Journal of Controlled Release* 146(3): 400–408. doi:10.1016/j.jconrel.2010.06.002.

Lee, Man Lung, Weiwei Jiang, Jack Chun Hin Chen, Wai Wing Cheng, Ellen Ngar-Yun Poon, Hiu Yee Kwan, and Hung-Wing Li. 2026. 'Biodegradable Polymersomes Encapsulating Copper Peroxide and Gemcitabine for Targeted Chemoimmunotherapy'. *Journal of Controlled Release* 393: 114772. doi:10.1016/j.jconrel.2026.114772.

Lee, Morgan B., Daniel R. Kramer, Terrance Peng, Michael F. Barbaro, Charles Y. Liu, Spencer Kellis, and Brian Lee. 2019. 'Clinical Neuroprosthetics: Today and Tomorrow'. *Journal of Clinical Neuroscience* 68: 13–19. doi:10.1016/j.jocn.2019.07.056.

Li, Michael C. H., and Mark J. Cook. 2017. 'Deep Brain Stimulation for Drug-resistant Epilepsy'. *Epilepsia*. doi:10.1111/epi.13964.

Li, Mimi, Xiaofang Ye, Zhengping Huang, Lichao Ye, and Chunnuan Chen. 2025. 'Global Burden of Parkinson's Disease from 1990 to 2021: A Population-Based Study'. *BMJ Open* 15(4): e095610. doi:10.1136/bmjopen-2024-095610.

Li, Zhezhe, Suzhen Wang, Yuzhe Ma, Jan C. M. van Hest, and Hailong Che. 2026. 'Engineering Gas-Releasing Polymersome Nanoreactors for Selective Biocatalytic Activation'. *Angewandte Chemie* 138(5): e22097. doi:10.1002/ange.202522097.

Lim Soo, Patrick, and Adi Eisenberg. 2004. 'Preparation of Block Copolymer Vesicles in Solution'. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. doi:10.1002/polb.10739.

Lindner, Mark D, and Dwaine F Emerich. 1998. 'Therapeutic Potential of a Polymer-Encapsulated l-DOPA and Dopamine-Producing Cell Line in Rodent and Primate Models of Parkinson's Disease'. *Cell Transplantation* 7(2): 165–74. doi:10.1016/S0963-6897(97)00169-3.

Lipinski, Christopher A., Franco Lombardo, Beryl W. Dominy, and Paul J. Feeney. 2001. 'Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings 1PII of Original Article: S0169-409X(96)00423-1. The Article Was Originally Published in Advanced Drug Delivery Reviews 23 (1997) 3–25. 1'. *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/S0169-409X(00)00129-0.

Little, Simon, Alex Pogosyan, Spencer Neal, Baltazar Zavala, Ludvic Zrinzo, Marwan Hariz, Thomas Foltynie, et al. 2013. 'Adaptive Deep Brain Stimulation in Advanced Parkinson Disease'. *Annals of Neurology* 74(3): 449–57. doi:10.1002/ana.23951.

LoPresti, Caterina, Hannah Lomas, Marzia Massignani, Thomas Smart, and Al Et. 2009. 'Polymersomes: Nature Inspired Nanometer Sized Compartments'. *Journal of Materials Chemistry*. doi:10.1039/b818869f.

Lorca-Cámara, Antonio, François G. C. Blot, and Nicolò Accanto. 2024. 'Recent Advances in Light Patterned Optogenetic Photostimulation in Freely Moving Mice'. *Neurophotonics* 11(Suppl 1): S11508. doi:10.1117/1.NPh.11.S1.S11508.

Löscher, Wolfgang, and Heidrun Potschka. 2005. 'Drug Resistance in Brain Diseases and the Role of Drug Efflux Transporters'. *Nature Reviews Neuroscience* 6(8): 591–602. doi:10.1038/nrn1728.

Lu, Chen-Wen, Yann Hung, Jong-Kai Hsiao, Ming Yao, Tsai-Hua Chung, Yu-Shen Lin, Si-Han Wu, et al. 2007. 'Bifunctional Magnetic Silica Nanoparticles for Highly Efficient Human Stem Cell Labeling'. *Nano Letters* 7(1): 149–54. doi:10.1021/nl0624263.

Mai, Yiyong, and Adi Eisenberg. 2012. 'Self-Assembly of Block Copolymers'. *Chemical Society Reviews*. doi:10.1039/C2CS35115C.

Manzano, Miguel, and María Vallet-Regí. 2019. 'Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery'. *Advanced Functional Materials*. doi:10.1002/adfm.201902634.

Marguet, Maïté, Colin Bonduelle, and Sébastien Lecommandoux. 2012. 'Multicompartmentalized Polymeric Systems: Towards Biomimetic Cellular Structure and Function'. *Chemical Society Reviews* 42(2): 512–29. doi:10.1039/C2CS35312A.

Mariniello, Annapaola, and Denis Migliorini. 2026. 'CAR-T Cell Therapies Are Coming after Glioblastoma: An Overview of Early Phase Clinical Trials and Future Perspectives'. *iScience* 29(2): 114609. doi:10.1016/j.isci.2025.114609.

Markowicz-Piasecka, Magdalena, Patrycja Darłak, Agata Markiewicz, Joanna Sikora, Santosh Kumar Adla, Sreelatha Bagina, and Kristiina M. Huttunen. 2022. 'Current Approaches to Facilitate Improved Drug Delivery to the Central Nervous System'. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 181: 249–62. doi:10.1016/j.ejpb.2022.11.003.

Massignani, Marzia, Hannah Lomas, and Giuseppe Battaglia. 2010. 'Polymersomes: A Synthetic Biological Approach to Encapsulation and Delivery'. In *Modern Techniques for Nano- and*

Microreactors/-Reactions, ed. Frank Caruso. Berlin, Heidelberg: Springer, 115–54. doi:10.1007/12_2009_40.

Matsumura, Yasuhiro, and Hiroshi Maeda. 1986. 'A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs'. *Cancer Research* 46(12_Part_1): 6387–92.

Mayberg, Helen S., Andres M. Lozano, Valerie Voon, Heather E. McNeely, David Seminowicz, Clement Hamani, Jason M. Schwalb, and Sidney H. Kennedy. 2005. 'Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression'. *Neuron* 45(5): 651–60. doi:10.1016/j.neuron.2005.02.014.

McGlynn, Eve, Vahid Nabaei, Elisa Ren, Gabriel Galeote-Checa, Rupam Das, Giulia Curia, and Hadi Heidari. 2021. 'The Future of Neuroscience: Flexible and Wireless Implantable Neural Electronics'. *Advanced Science* 8(10): 2002693. doi:10.1002/advs.202002693.

Mertz, Michael, and Kathrin Castiglione. 2021. 'Increased Protein Encapsulation in Polymersomes with Hydrophobic Membrane Anchoring Peptides in a Scalable Process'. *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms22137134.

Messager, Lea, Jonathan R. Burns, Jungyeon Kim, Denis Cecchin, James Hindley, Alice L. B. Pyne, Jens Gaitzsch, Giuseppe Battaglia, and Stefan Howorka. 2016. 'Biomimetic Hybrid Nanocontainers with Selective Permeability'. *Angewandte Chemie International Edition* 55(37): 11106–9. doi:10.1002/anie.201604677.

Messager, Léa, Jens Gaitzsch, Luca Chierico, and Giuseppe Battaglia. 2014. 'Novel Aspects of Encapsulation and Delivery Using Polymersomes'. *Current Opinion in Pharmacology*. doi:10.1016/j.coph.2014.09.017.

Mich, John K., Jiyun Ryu, Aguan D. Wei, Bryan B. Gore, Rong Guo, Angela M. Bard, Refugio A. Martinez, et al. 2025. 'Interneuron-Specific Dual-AAV SCN1A Gene Replacement Corrects Epileptic Phenotypes in Mouse Models of Dravet Syndrome'. *Science Translational Medicine* 17(790): eadn5603. doi:10.1126/scitranslmed.adn5603.

Mikitsh, John L., and Ann-Marie Chacko. 2014. 'Pathways for Small Molecule Delivery to the Central Nervous System across the Blood-Brain Barrier'. *Perspectives in Medicinal Chemistry* 6: PMC.S13384. doi:10.4137/PMC.S13384.

Milekovic, Tomislav, Eduardo Martin Moraud, Nicolo Macellari, Charlotte Moerman, Flavio Raschellà, Shiqi Sun, Matthew G. Perich, et al. 2023. 'A Spinal Cord Neuroprosthesis for Locomotor Deficits Due to Parkinson's Disease'. *Nature Medicine* 29(11): 2854–65. doi:10.1038/s41591-023-02584-1.

Mitchell, Michael J., Margaret M. Billingsley, Rebecca M. Haley, Marissa E. Wechsler, Nicholas A. Peppas, and Robert Langer. 2021. 'Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery'. *Nature Reviews. Drug Discovery* 20(2): 101–24. doi:10.1038/s41573-020-0090-8.

Moghassemi, Saeid, and Afra Hadjizadeh. 2014a. 'Nano-Niosomes as Nanoscale Drug Delivery Systems: An Illustrated Review'. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.015.

Moghassemi, Saeid, and Afra Hadjizadeh. 2014b. 'Nano-Niosomes as Nanoscale Drug Delivery Systems: An Illustrated Review'. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.015.

Monge-Fuentes, Victoria, Andréia Biolchi Mayer, Marcos Robalinho Lima, Luiza Ribeiro Geraldes, Larissa Nepomuceno Zanotto, Karla Graziella Moreira, Olimpia Paschoal Martins, et al. 2021. 'Dopamine-Loaded Nanoparticle Systems Circumvent the Blood–Brain Barrier Restoring Motor Function in Mouse Model for Parkinson's Disease'. *Scientific Reports* 11: 15185. doi:10.1038/s41598-021-94175-8.

Moquin, Alexandre, Jeff Ji, Kevin Neibert, Françoise M. Winnik, and Dusica Maysinger. 2018. 'Encapsulation and Delivery of Neutrophic Proteins and Hydrophobic Agents Using PMOXA–PDMS–PMOXA Triblock Polymersomes'. *ACS Omega* 3(10): 13882–93. doi:10.1021/acsomega.8b02311.

Moreau, Caroline, Pascal Odou, Julien Labreuche, Alexandre Demailly, Gustavo Touzet, Nicolas Reyns, Bastien Gouges, et al. 2025. 'Dopamine Anaérobie Intracérébroventriculaire Dans La Maladie de Parkinson Avec Complications Liées à La l -Dopa : Un Essai Contrôlé Randomisé de Phase 1/2'. *Nature Medicine* 31(3): 819–28. doi:10.1038/s41591-024-03428-2.

Moreau, Caroline, Anne Sophie Rolland, Elsa Pioli, Qin Li, Pascal Odou, Christine Barthelemy, Damien Lannoy, et al. 2020. 'Intraventricular Dopamine Infusion Alleviates Motor Symptoms in a Primate Model of Parkinson's Disease'. *Neurobiology of Disease* 139: 104846. doi:10.1016/j.nbd.2020.104846.

Movahedpour, Ahmad, Rasul Taghvaeefar, Ali-Akbar Asadi-Pooya, Yousof Karami, Ronia Tavasolian, Seyyed Hossein Khatami, Elahe Soltani Fard, et al. 2023. 'Nano-Delivery Systems as a Promising Therapeutic Potential for Epilepsy: Current Status and Future Perspectives'. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 29(11): 3150–59. doi:10.1111/cns.14355.

Mudry, Albert, and Mara Mills. 2013. 'The Early History of the Cochlear Implant: A Retrospective'. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 139(5): 446–53. doi:10.1001/jamaoto.2013.293.

Nam, Joo Yeon, and John F. de Groot. 2017. 'Treatment of Glioblastoma'. *Journal of Oncology Practice*. doi:10.1200/JOP.2017.025536.

Nance, Elizabeth, Suzie H. Pun, Rajiv Saigal, and Drew L. Sellers. 2022. 'Drug Delivery to the Central Nervous System'. *Nature reviews. Materials* 7(4): 314–31. doi:10.1038/s41578-021-00394-w.

'National Institutes of Health (NIH)'. 2025. https://www.nih.gov/research-training/nanotechnology-nih (April 1, 2026).

Nourski, Kirill V., Christine P. Etler, John F. Brugge, Hiroyuki Oya, Hiroto Kawasaki, Richard A. Reale, Paul J. Abbas, Carolyn J. Brown, and Matthew A. Howard. 2013. 'Direct Recordings from the Auditory Cortex in a Cochlear Implant User'. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 14(3): 435–50. doi:10.1007/s10162-013-0382-3.

Obeso, J. A., M. Stamelou, C. G. Goetz, W. Poewe, and Al Et. 2017. 'Past, Present, and Future of Parkinson's Disease: A Special Essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy'. *Movement Disorders*. doi:10.1002/mds.27115.

'Organisation mondiale de la Santé'. 2024. https://www.who.int/fr/news/item/14-03-2024-over-1-in-3-people-affected-by-neurological-conditions--the-leading-cause-of-illness-and-disability-worldwide (May 11, 2026).

Owen, Scott F., Max H. Liu, and Anatol C. Kreitzer. 2019. 'Thermal Constraints on in Vivo Optogenetic Manipulations'. *Nature Neuroscience* 22(7): 1061–65. doi:10.1038/s41593-019-0422-3.

Palivan, Cornelia G., Roland Goers, Adrian Najer, Xiaoyan Zhang, and Al Et. 2016. 'Bioinspired Polymer Vesicles and Membranes for Biological and Medical Applications'. *Chemical Society Reviews*. doi:10.1039/c5cs00569h.

Palivan, Cornelia G., Lukas Heuberger, Jens Gaitzsch, Brigitte Voit, Dietmar Appelhans, Barbara Borges Fernandes, Giuseppe Battaglia, et al. 2024. 'Advancing Artificial Cells with Functional Compartmentalized Polymeric Systems - In Honor of Wolfgang Meier'. *Biomacromolecules* 25(9): 5454–67. doi:10.1021/acs.biomac.4c00769.

Pande, Shantanu. 2023. 'Liposomes for Drug Delivery: Review of Vesicular Composition, Factors Affecting Drug Release and Drug Loading in Liposomes'. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 51(1): 428–40. doi:10.1080/21691401.2023.2247036.

Pangu, Gautam D., Kevin P. Davis, Frank S. Bates, and Daniel A. Hammer. 2010. 'Ultrasonically Induced Release from Nanosized Polymer Vesicles'. *Macromolecular Bioscience*. doi:10.1002/mabi.201000081.

Pardridge, W. M. 2003. 'BLOOD-BRAIN BARRIER DRUG TARGETING: THE FUTURE OF BRAIN DRUG DEVELOPMENT'. *Molecular Interventions*. doi:10.1124/mi.3.2.90.

Pardridge, William M. 2005. 'The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development'. *NeuroRX* 2(1): 3–14. doi:10.1602/neurorx.2.1.3.

Park, Kyeng Min, Don-Wook Lee, Bijay Sarkar, Hyuntae Jung, Jeeyeon Kim, Young Ho Ko, Kyung Eun Lee, Hyesung Jeon, and Kimoon Kim. 2010. 'Reduction-Sensitive, Robust Vesicles with a Non-Covalently Modifiable Surface as a Multifunctional Drug-Delivery Platform'. *Small* 6(13): 1430–41. doi:10.1002/smll.201000293.

Park, Sung Il, Daniel S. Brenner, Gunchul Shin, Clinton D. Morgan, and Al Et. 2015. 'Soft, Stretchable, Fully Implantable Miniaturized Optoelectronic Systems for Wireless Optogenetics'. *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/nbt.3415.

Park, Sung Il, Gunchul Shin, Anthony Banks, Jordan G. McCall, Edward R. Siuda, Martin J. Schmidt, Ha Uk Chung, et al. 2015. 'Ultraminiaturized Photovoltaic and Radio Frequency Powered Optoelectronic Systems for Wireless Optogenetics'. *Journal of neural engineering* 12(5): 056002. doi:10.1088/1741-2560/12/5/056002.

Parnell, A. J., N. Tzokova, P. D. Topham, D. J. Adams, and Al Et. 2009. 'The Efficiency of Encapsulation within Surface Rehydrated Polymersomes'. *Faraday Discussions*. doi:10.1039/b902574j.

Partridge, Brittanie, Allison Eardley, Brianna E. Morales, Sabrina N. Campelo, Melvin F. Lorenzo, Jason N. Mehta, Yukitaka Kani, et al. 2022. 'Advancements in Drug Delivery Methods for the Treatment of Brain Disease'. *Frontiers in Veterinary Science* 9. doi:10.3389/fvets.2022.1039745.

Pautot, Sophie, Barbara J. Frisken, and D. A. Weitz. 2003. 'Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion'. *Langmuir* 19(7): 2870–79. doi:10.1021/la026100v.

Peer, Dan, Jeffrey M. Karp, Seungpyo Hong, Omid C. Farokhzad, and Al Et. 2007. 'Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy'. *Nature Nanotechnology*. doi:10.1038/nnano.2007.387.

Pena, Erik S., Elizabeth G. Graham-Gurysh, Eric M. Bachelder, and Kristy M. Ainslie. 2021. 'Design of Biopolymer-Based Interstitial Therapies for the Treatment of Glioblastoma'. *International Journal of Molecular Sciences* 22(23): 13160. doi:10.3390/ijms222313160.

Perlmutter, Joel S., and Jonathan W. Mink. 2006. 'DEEP BRAIN STIMULATION'. *Annual Review of Neuroscience*. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112824.

Pesce, Cristiano, Giulia Rodella, Agnese Fragassi, Mariangela Garofalo, Stefano Salmaso, Paolo Caliceti, Bernard Gallez, and Alessio Malfanti. 2025. 'Localized Treatment of Glioblastoma: A Review of Clinical Strategies and Advances in Drug Delivery Systems'. *Nanomedicine* 20(20): 2571–99. doi:10.1080/17435889.2025.2550239.

Peters, Ruud J. R. W., Maïté Marguet, Sébastien Marais, Marco W. Fraaije, Jan C. M. van Hest, and Sébastien Lecommandoux. 2014. 'Cascade Reactions in Multicompartmentalized Polymersomes'. *Angewandte Chemie International Edition* 53(1): 146–50. doi:10.1002/anie.201308141.

Peyret, Ariane, Emmanuel Ibarboure, Jean-François Le Meins, and Sebastien Lecommandoux. 2017. 'Asymmetric Hybrid Polymer–Lipid Giant Vesicles as Cell Membrane Mimics'. doi:10.1002/advs.201700453.

Peyret, Ariane, Emmanuel Ibarboure, Arnaud Tron, Louis Beauté, Ruben Rust, Olivier Sandre, Nathan D. McClenaghan, and Sebastien Lecommandoux. 2017a. 'Polymersome Popping by Light-Induced Osmotic Shock under Temporal, Spatial, and Spectral Control'. *Angewandte Chemie International Edition* 56(6): 1566–70. doi:10.1002/anie.201609231.

Peyret, Ariane, Emmanuel Ibarboure, Arnaud Tron, Louis Beauté, Ruben Rust, Olivier Sandre, Nathan D. McClenaghan, and Sebastien Lecommandoux. 2017b. 'Polymersome Popping by Light-Induced Osmotic Shock under Temporal, Spatial, and Spectral Control'. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 56(6): 1566–70. doi:10.1002/anie.201609231.

Pitz, Marshall W., Arati Desai, Stuart A. Grossman, and Jaishri O. Blakeley. 2011. 'Tissue Concentration of Systemically Administered Antineoplastic Agents in Human Brain Tumors'. *Journal of Neuro-Oncology* 104(3): 629–38. doi:10.1007/s11060-011-0564-y.

Poisson, Jacques. 2003. 'Galénique : vous avez dit galénique ?' https://www.persee.fr/doc/pharm_0035-2349_2003_num_91_337_5494 (June 6, 2026).

Politis, Anastasios, Lampis Stavrinou, Aristotelis Kalyvas, Efstathios Boviatsis, and Christina Piperi. 2025. 'Glioblastoma: Molecular Features, Emerging Molecular Targets and Novel Therapeutic Strategies'. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 212: 104764. doi:10.1016/j.critrevonc.2025.104764.

Puisieux, F., M. Seiller, and J. -P. Devissaguet. 2006. 'Les Systèmes de Délivrance Des Médicaments : Un Réel Progress Pour La Thérapeutique*'. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 64(4): 219–59. doi:10.1016/S0003-4509(06)75318-4.

Pycroft, Laurie, John Stein, and Tipu Aziz. 2018. 'Deep Brain Stimulation: An Overview of History, Methods, and Future Developments'. *Brain and Neuroscience Advances* 2: 2398212818816017. doi:10.1177/2398212818816017.

Qazi, Raza, Choong Yeon Kim, Sang-Hyuk Byun, and Jae-Woong Jeong. 2018. 'Microscale Inorganic LED Based Wireless Neural Systems for Chronic in Vivo Optogenetics'. *Frontiers in Neuroscience* 12: 764. doi:10.3389/fnins.2018.00764.

Qin, S., Y. Geng, D. E. Discher, and S. Yang. 2006. 'Temperature-Controlled Assembly and Release from Polymer Vesicles of Poly(Ethylene Oxide)-Block- Poly(N-Isopropylacrylamide)'. *Advanced Materials* 18(21): 2905–9. doi:10.1002/adma.200601019.

Ribatti, Domenico, Beatrice Nico, Enrico Crivellato, and Marco Artico. 2006. 'Development of the Blood-brain Barrier: A Historical Point of View'. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist* 289B(1): 3–8. doi:10.1002/ar.b.20087.

Rideau, Emeline, Rumiana Dimova, Petra Schwille, Frederik R. Wurm, and Katharina Landfester. 2018. 'Liposomes and Polymersomes: A Comparative Review towards Cell Mimicking'. *Chemical Society Reviews* 47(23): 8572–8610. doi:10.1039/C8CS00162F.

Roa, Jorge A., Marina Abramova, Madeline Fields, Maite La Vega-Talbott, Jiyeoun Yoo, Lara Marcuse, Steven Wolf, et al. 2022. 'Responsive Neurostimulation of the Thalamus for the Treatment of Refractory Epilepsy'. *Frontiers in Human Neuroscience* 16: 926337. doi:10.3389/fnhum.2022.926337.

Robbins, Gregory P., Masaya Jimbo, Joe Swift, Michael J. Therien, Daniel A. Hammer, and Ivan J. Dmochowski. 2009. 'Photoinitiated Destruction of Composite Porphyrin−Protein Polymersomes'. *Journal of the American Chemical Society* 131(11): 3872–74. doi:10.1021/ja808586q.

Rognin, Etienne, Niamh Willis-Fox, and Ronan Daly. 2023. 'Quantitative Monitoring and Modelling of Retrodialysis Drug Delivery in a Brain Phantom'. *Scientific Reports* 13(1): 1900. doi:10.1038/s41598-023-28915-3.

Rolfe, Nathaniel W., Nicholas B. Dadario, Peter Canoll, and Jeffrey N. Bruce. 2024. 'A Review of Therapeutic Agents Given by Convection-Enhanced Delivery for Adult Glioblastoma'. *Pharmaceuticals* 17(8): 973. doi:10.3390/ph17080973.

Saha, Sarmistha, and Luciano Saso. 2023. 'Identity Crisis of Nanostructures inside the Human Body: A Perspective on Inflammation'. *Frontiers in Nanotechnology* 5. doi:10.3389/fnano.2023.1256952.

Sahel, José-Alain, Elise Boulanger-Scemama, Chloé Pagot, Angelo Arleo, and Al Et. 2021. 'Partial Recovery of Visual Function in a Blind Patient after Optogenetic Therapy'. *Nature Medicine*. doi:10.1038/s41591-021-01351-4.

Şahin, Şule, Elif Kaya-Tilki, Merve Baysal, and A. Alper Öztürk. 2025. 'Preparation and Evaluation of Temozolomide Loaded PLGA Nanoparticles for the Treatment of Glioblastoma Multiforme'. *Scientific Reports* 15(1): 36194. doi:10.1038/s41598-025-20012-x.

Salkho, Najla M., Nahid S. Awad, William G. Pitt, and Ghaleb A. Husseini. 2022. 'Photo-Induced Drug Release from Polymeric Micelles and Liposomes: Phototriggering Mechanisms in Drug Delivery Systems'. *Polymers* 14(7): 1286. doi:10.3390/polym14071286.

Sanson, Charles, Odile Diou, Julie Thévenot, Emmanuel Ibarboure, Alain Soum, Annie Brûlet, Sylvain Miraux, et al. 2011. 'Doxorubicin Loaded Magnetic Polymersomes: Theranostic Nanocarriers

for MR Imaging and Magneto-Chemotherapy'. *ACS Nano* 5(2): 1122–40. doi:10.1021/nn102762f.

Schäfer-Korting, Monika, and Ulrich S. Schubert, eds. 2024. 284 *Drug Delivery and Targeting*. Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-031-52864-4.

Schinkel, Alfred H. 1999. 'P-Glycoprotein, a Gatekeeper in the Blood–Brain Barrier'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 36(2): 179–94. doi:10.1016/S0169-409X(98)00085-4.

Schöttler, Susanne, Katharina Landfester, and Volker Mailänder. 2016. 'Controlling the Stealth Effect of Nanocarriers through Understanding the Protein Corona'. *Angewandte Chemie International Edition*. doi:10.1002/anie.201602233.

Segev, Eran, Jacob Reimer, Laurent C. Moreaux, Trevor M. Fowler, Derrick Chi, Wesley D. Sacher, Maisie Lo, et al. 2017. 'Patterned Photostimulation via Visible-Wavelength Photonic Probes for Deep Brain Optogenetics'. *Neurophotonics* 4(1): 011002. doi:10.1117/1.NPh.4.1.011002.

Seleci, Muharrem, Didem Ag Seleci, Rebecca Joncyzk, Frank Stahl, and Al Et. 2016. 'Smart Multifunctional Nanoparticles in Nanomedicine'. *BioNanoMaterials*. doi:10.1515/bnm-2015-0030.

Sercombe, Lisa, Tejaswi Veerati, Fatemeh Moheimani, Sherry Y. Wu, Anil K. Sood, and Susan Hua. 2015. 'Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery'. *Frontiers in Pharmacology* 6. doi:10.3389/fphar.2015.00286.

Sessolo, Michele, Iacopo Marcon, Serena Bovetti, Gabriele Losi, Mario Cammarota, Gian Michele Ratto, Tommaso Fellin, and Giorgio Carmignoto. 2015. 'Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons Oppose Propagation But Favor Generation of Focal Epileptiform Activity'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35(26): 9544–57. doi:10.1523/JNEUROSCI.5117-14.2015.

Shin, Gunchul, Adrian M. Gomez, Ream Al-Hasani, Yu Ra Jeong, Jeonghyun Kim, Zhaoqian Xie, Anthony Banks, et al. 2017. 'Flexible Near-Field Wireless Optoelectronics as Subdermal Implants for Broad Applications in Optogenetics'. *Neuron* 93(3): 509-521.e3. doi:10.1016/j.neuron.2016.12.031.

Siegel, Ronald A., and Michael J. Rathbone. 2012. 'Overview of Controlled Release Mechanisms'. In *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, eds Juergen Siepmann, Ronald A. Siegel, and Michael J. Rathbone. Boston, MA: Springer US, 19–43. doi:10.1007/978-1-4614-0881-9_2.

Sillay, Karl A., S. Gray McClatchy, Brandon A. Shepherd, Garrett T. Venable, and Tyler S. Fuehrer. 2014. 'Image-Guided Convection-Enhanced Delivery into Agarose Gel Models of the Brain'. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (87): 51466. doi:10.3791/51466.

Silva, Patrícia, and Luis Jacinto. 2025. 'Wireless Devices for Optical Brain Stimulation: A Review of Current Developments for Optogenetic Applications in Freely Moving Mice'. *Cellular and Molecular Bioengineering* 18(1): 1–13. doi:10.1007/s12195-024-00832-z.

Singh, Anurag, and John N. J. Reynolds. 2024. 'Therapeutic Ultrasound: An Innovative Approach for Targeting Neurological Disorders Affecting the Basal Ganglia'. *Frontiers in Neuroanatomy* 18. doi:10.3389/fnana.2024.1469250.

Sisterson, Nathaniel D., Thomas A. Wozny, Vasileios Kokkinos, Alexander Constantino, and R. Mark Richardson. 2019. 'Closed-Loop Brain Stimulation for Drug-Resistant Epilepsy: Towards an Evidence-Based Approach to Personalized Medicine'. *Neurotherapeutics* 16(1): 119–27. doi:10.1007/s13311-018-00682-4.

Skarpaas, Tara L., Beata Jarosiewicz, and Martha J. Morrell. 2019. 'Neurostimulation Cérébrale Réactive Pour l'épilepsie (Système RNS®)'. *Epilepsy Research* 153: 68–70. doi:10.1016/j.eplepsyres.2019.02.003.

Smith, Douglas C., Scott E. Krahl, Ronald A. Browning, and Edwin J. Barea. 1993. 'Rapid Cessation of Focally Induced Generalized Seizures in Rats Through Microinfusion of Lidocaine Hydrochloride into the Focus'. doi:10.1111/j.1528-1157.1993.tb02374.x.

Sporns, Olaf. 2013. 'Structure and Function of Complex Brain Networks'. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 15(3): 247–62. doi:10.31887/DCNS.2013.15.3/osporns.

Sporns, Olaf, and Richard F. Betzel. 2016. 'Modular Brain Networks'. *Annual Review of Psychology*. doi:10.1146/annurev-psych-122414-033634.

Spulber, Mariana, Patric Baumann, Sina S. Saxer, Uwe Pieles, Wolfgang Meier, and Nico Bruns. 2014. 'Poly(N-Vinylpyrrolidone)-Poly(Dimethylsiloxane)-Based Polymersome Nanoreactors for Laccase-Catalyzed Biotransformations'. *Biomacromolecules* 15(4): 1469–75. doi:10.1021/bm500081j.

Stadelmann, Christine, Sebastian Timmler, Alonso Barrantes-Freer, and Mikael Simons. 2019. 'Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology'. *Physiological Reviews* 99(3): 1381–1431. doi:10.1152/physrev.00031.2018.

Stamatakis, Alice M., Mike J. Schachter, Srishti Gulati, Kevin T. Zitelli, Sam Malanowski, Arash Tajik, Christopher Fritz, Mark Trulson, and Stephani L. Otte. 2018. 'Simultaneous Optogenetics and Cellular Resolution Calcium Imaging During Active Behavior Using a Miniaturized Microscope'. *Frontiers in Neuroscience* 12: 496. doi:10.3389/fnins.2018.00496.

Stiepel, Rebeca T., Eliza Duggan, Cole J. Batty, and Kristy M. Ainslie. 2023. 'Micro and Nanotechnologies: The Little Formulations That Could'. *Bioengineering & Translational Medicine* 8(2): e10421. doi:10.1002/btm2.10421.

Stupp, Roger, Marc Gander, Serge Leyvraz, and Edward Newlands. 2001. 'Current and Future Developments in the Use of Temozolomide for the Treatment of Brain Tumours'. *The Lancet Oncology*. doi:10.1016/s1470-2045(01)00489-2.

Stupp, Roger, Warren P. Mason, Martin J. van den Bent, Michael Weller, Barbara Fisher, Martin J. B. Taphoorn, Karl Belanger, et al. 2005. 'Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma'. *New England Journal of Medicine* 352(10): 987–96. doi:10.1056/NEJMoa043330.

van Swaay, Dirk, and Andrew deMello. 2013. 'Microfluidic Methods for Forming Liposomes'. *Lab on a Chip*. doi:10.1039/c2lc41121k.

Sweeney, Melanie D., Zhen Zhao, Axel Montagne, Amy R. Nelson, and Al Et. 2019. 'Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back'. *Physiological Reviews*. doi:10.1152/physrev.00050.2017.

Tabar, V., H. Sarva, A. M. Lozano, A. Fasano, S. K. Kalia, K. K. H. Yu, C. Brennan, et al. 2025. 'Phase I Trial of hES Cell-Derived Dopaminergic Neurons for Parkinson's Disease'. *Nature* 641(8064): 978–83. doi:10.1038/s41586-025-08845-y.

Tan, Yun-Long, Yi Yuan, and Li Tian. 2020. 'Microglial Regional Heterogeneity and Its Role in the Brain'. *Molecular Psychiatry* 25(2): 351–67. doi:10.1038/s41380-019-0609-8.

Terstappen, Georg C., Axel H. Meyer, Robert D. Bell, and Wandong Zhang. 2021. 'Strategies for Delivering Therapeutics across the Blood–Brain Barrier'. *Nature Reviews Drug Discovery*. doi:10.1038/s41573-021-00139-y.

Towne, Chris, and Kimberly R. Thompson. 2016. 'Overview on Research and Clinical Applications of Optogenetics'. *Current Protocols in Pharmacology*. doi:10.1002/cpph.13.

Turner, Thomas J., Clara Zourray, Stephanie Schorge, and Gabriele Lignani. 2021. 'Recent Advances in Gene Therapy for Neurodevelopmental Disorders with Epilepsy'. *Journal of Neurochemistry* 157(2): 229–62. doi:10.1111/jnc.15168.

University of Oxford. 2019. *A Proof of Concept Study to Investigate the Feasibility of Targeted Release of Doxorubicin From Lyso-Thermosensitive Liposomal (LTSL) Doxorubicin (ThermoDox®) Using Focused Ultrasound in Patients With Primary or Secondary Liver Tumours*. clinicaltrials.gov. Clinical trial registration. https://clinicaltrials.gov/study/NCT02181075 (May 27, 2026).

Van Tellingen, O., B. Yetkin-Arik, M.C. De Gooijer, P. Wesseling, T. Wurdinger, and H.E. De Vries. 2015. 'Overcoming the Blood–Brain Tumor Barrier for Effective Glioblastoma Treatment'. *Drug Resistance Updates* 19: 1–12. doi:10.1016/j.drup.2015.02.002.

Vendel, Esmée, Vivi Rottschäfer, and Elizabeth C. M. de Lange. 2019. 'The Need for Mathematical Modelling of Spatial Drug Distribution within the Brain'. *Fluids and Barriers of the CNS* 16(1): 12. doi:10.1186/s12987-019-0133-x.

Venkataramani, Varun, Dimitar Ivanov Tanev, Christopher Strahle, Alexander Studier-Fischer, Laura Fankhauser, Tobias Kessler, Christoph Körber, et al. 2019. 'Glutamatergic Synaptic Input to Glioma Cells Drives Brain Tumour Progression'. *Nature* 573(7775): 532–38. doi:10.1038/s41586-019-1564-x.

Venkataramani, Varun, Yvonne Yang, Marc Cicero Schubert, Ekin Reyhan, Svenja Kristin Tetzlaff, Niklas Wißmann, Michael Botz, et al. 2022. 'Glioblastoma Hijacks Neuronal Mechanisms for Brain Invasion'. *Cell* 185(16): 2899-2917.e31. doi:10.1016/j.cell.2022.06.054.

Verkhratsky, Alexei, and Maiken Nedergaard. 2018. 'Physiology of Astroglia'. *Physiological Reviews* 98(1): 239–389. doi:10.1152/physrev.00042.2016.

van Vliet, Emile F., Maarten J. Knol, Raymond M. Schiffelers, Massimiliano Caiazzo, and Marcel H. A. M. Fens. 2023. 'Levodopa-Loaded Nanoparticles for the Treatment of Parkinson's Disease'. *Journal of Controlled Release* 360: 212–24. doi:10.1016/j.jconrel.2023.06.026.

Wagner, Volker, Anwyn Dullaart, Anne-Katrin Bock, and Axel Zweck. 2006. 'The Emerging Nanomedicine Landscape'. *Nature Biotechnology* 24(10): 1211–17. doi:10.1038/nbt1006-1211.

Walkey, Carl D., and Warren C. W. Chan. 2012. 'Understanding and Controlling the Interaction of Nanomaterials with Proteins in a Physiological Environment'. *Chemical Society Reviews* 41(7): 2780–99. doi:10.1039/C1CS15233E.

Wang, Guoying, Ningyang Wang, Xue Xia, Muhammad Ismail, and Bingyang Shi. 2026. 'Clinical Translation of Nanomedicines for Brain Diseases: Current Challenges and Future Directions'. *Journal of Controlled Release* 389: 114426. doi:10.1016/j.jconrel.2025.114426.

Wang, Jingyu, Wenling Zhao, Zhao Zhang, Xingzi Liu, Tong Xie, Lan Wang, Yuzhou Xue, and Yuemiao Zhang. 2024. 'A Journey of Challenges and Victories: A Bibliometric Worldview of Nanomedicine since the 21st Century'. *Advanced Materials* 36(15): 2308915. doi:10.1002/adma.202308915.

Waris, Abdul, Ata Ullah, Muhammad Asim, Rafi Ullah, Md. Rafe Rajdoula, Stephen Temitayo Bello, and Fahad A. Alhumaydhi. 2024. 'Phytotherapeutic Options for the Treatment of Epilepsy: Pharmacology, Targets, and Mechanism of Action'. *Frontiers in Pharmacology* 15: 1403232. doi:10.3389/fphar.2024.1403232.

Weiss, Raymond B., and Brian F. Issell. 1982. 'The Nitrosoureas: Carmustine (BCNU) and Lomustine (CCNU)'. *Cancer Treatment Reviews* 9(4): 313–30. doi:10.1016/S0305-7372(82)80043-1.

Weller, Johannes, Anna-Laura Potthoff, Thomas Zeyen, Christina Schaub, Cathrina Duffy, Matthias Schneider, and Ulrich Herrlinger. 2024. 'Current Status of Precision Oncology in Adult Glioblastoma'. *Molecular Oncology* 18(12): 2927–50. doi:10.1002/1878-0261.13678.

Weller, Michael, Patrick Y. Wen, Susan M. Chang, Linda Dirven, Michael Lim, Michelle Monje, and Guido Reifenberger. 2024. 'Glioma'. *Nature Reviews Disease Primers* 10(1): 33. doi:10.1038/s41572-024-00516-y.

Whitesides, George M. 2003. 'The "right" Size in Nanobiotechnology'. *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/nbt872.

Wilhelm, Stefan, Anthony J. Tavares, Qin Dai, Seiichi Ohta, and Al Et. 2016. 'Analysis of Nanoparticle Delivery to Tumours'. *Nature Reviews Materials*. doi:10.1038/natrevmats.2016.14.

Winkler, Frank, Humsa S. Venkatesh, Moran Amit, Tracy Batchelor, Ihsan Ekin Demir, Benjamin Deneen, David H. Gutmann, et al. 2023. 'Cancer Neuroscience: State of the Field, Emerging Directions'. *Cell* 186(8): 1689–1707. doi:10.1016/j.cell.2023.02.002.

'World Health Organization'. 2024. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy (June 24, 2026).

Wu, Di, Qi Chen, Xiaojie Chen, Feng Han, Zhong Chen, and Yi Wang. 2023. 'The Blood–Brain Barrier: Structure, Regulation, and Drug Delivery'. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8(1): 1–27. doi:10.1038/s41392-023-01481-w.

Wu, Di, Fan Fei, Qi Zhang, Xia Wang, Yiwei Gong, Xiaojie Chen, Yuyi Zheng, et al. 2022. 'Nanoengineered On-Demand Drug Delivery System Improves Efficacy of Pharmacotherapy for Epilepsy'. *Science Advances* 8(2): eabm3381. doi:10.1126/sciadv.abm3381.

Yang, Xiaoqiang, Jamison J. Grailer, Ian J. Rowland, Alireza Javadi, Samuel A. Hurley, Vyara Z. Matson, Douglas A. Steeber, and Shaoqin Gong. 2010. 'Multifunctional Stable and pH-Responsive Polymer Vesicles Formed by Heterofunctional Triblock Copolymer for Targeted Anticancer

Drug Delivery and Ultrasensitive MR Imaging'. *ACS nano* 4(11): 6805–17. doi:10.1021/nn101670k.

Yang, Yang, Kaiqi Long, Yuxiu Chu, Huiping Lu, Weiping Wang, and Changyou Zhan. 2024. 'Photoresponsive Drug Delivery Systems: Challenges and Progress'. *Advanced Functional Materials* 34(38): 2402975. doi:10.1002/adfm.202402975.

Yao, Zizhen, Hanqing Liu, Fangming Xie, Stephan Fischer, Ricky S. Adkins, Andrew I. Aldridge, Seth A. Ament, et al. 2021. 'A Transcriptomic and Epigenomic Cell Atlas of the Mouse Primary Motor Cortex'. *Nature* 598(7879): 103–10. doi:10.1038/s41586-021-03500-8.

Yawo, Hiromu. 2021. *Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications in Neuroscience and Beyond*. Second edition.. Singapore: Springer.

Yu, Chunxiu, Isaac R. Cassar, Jaydeep Sambangi, and Warren M. Grill. 2020. 'Frequency-Specific Optogenetic Deep Brain Stimulation of Subthalamic Nucleus Improves Parkinsonian Motor Behaviors'. *Journal of Neuroscience* 40(22): 4323–34. doi:10.1523/JNEUROSCI.3071-19.2020.

Yue, Zhan-Guo, Wei Wei, Pi-Ping Lv, Hua Yue, and Al Et. 2011. 'Surface Charge Affects Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Chitosan-Based Nanoparticles'. *Biomacromolecules*. doi:10.1021/bm101482r.

Zangiabadi, Nasser, Lady Diana Ladino, Farzad Sina, Juan Pablo Orozco-Hernández, Alexandra Carter, and José Francisco Téllez-Zenteno. 2019. 'Deep Brain Stimulation and Drug-Resistant Epilepsy: A Review of the Literature'. *Frontiers in Neurology* 10. doi:10.3389/fneur.2019.00601.

Zhang, Jinyong, Ryan N. Hughes, Namsoo Kim, Isabella P. Fallon, Konstantin Bakhurin, Jiwon Kim, Francesco Paolo Ulloa Severino, and Henry H. Yin. 2023. 'A One-Photon Endoscope for Simultaneous Patterned Optogenetic Stimulation and Calcium Imaging in Freely Behaving Mice'. *Nature Biomedical Engineering* 7(4): 499–510. doi:10.1038/s41551-022-00920-3.

Zhang, Lifeng, and Adi Eisenberg. 1995. 'Multiple Morphologies of "Crew-Cut" Aggregates of Polystyrene-b-Poly(Acrylic Acid) Block Copolymers'. *Science* 268(5218): 1728–31. doi:10.1126/science.268.5218.1728.

Zhang, Yi, Daniel C. Castro, Yuan Han, Yixin Wu, Hexia Guo, Zhengyan Weng, Yeguang Xue, et al. 2019. 'Battery-Free, Lightweight, Injectable Microsystem for in Vivo Wireless Pharmacology and Optogenetics'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(43): 21427–37. doi:10.1073/pnas.1909850116.

Zhou, Jian, Long Gu, Fengling Du, Chun Li, Fan Zhang, Xianhui Zhang, Jinwei Pang, et al. 2025. 'The Global, Regional, and National Brain and CNS Cancers Burden and Trends from 1990 to 2021'. *Scientific Reports* 15(1): 19228. doi:10.1038/s41598-025-04636-7.

Zhu, Bingzhao, Uisub Shin, and Mahsa Shoaran. 2021. 'Closed-Loop Neural Prostheses with On-Chip Intelligence: A Review and A Low-Latency Machine Learning Model for Brain State Detection'. *IEEE transactions on biomedical circuits and systems* 15(5): 877–97. doi:10.1109/TBCAS.2021.3112756.

Zhu, Danqing, Hunter J. Johnson, Jun Chen, and David V. Schaffer. 2022. 'Optogenetic Application to Investigating Cell Behavior and Neurological Disease'. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 16: 811493. doi:10.3389/fncel.2022.811493.

Zlokovic, Berislav V. 2008. 'The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders'. *Neuron*. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003.

Zrenner, Christoph, and Ulf Ziemann. 2024. 'Closed-Loop Brain Stimulation'. *Biological Psychiatry* 95(6): 545–52. doi:10.1016/j.biopsych.2023.09.014.

Résumé de thèse

De nombreuses maladies neurologiques et neuropsychiatriques restent mal soignées et constituent une cause majeure d'invalidité dans le monde. Plusieurs de ces pathologies sont localisées dans une zone précise du cerveau et leur traitement reste insuffisant : les médicaments administrés par voie systémique n'atteignent les zones pathologiques qu'en concentrations limitées et sans contrôle spatio-temporel précis. Si la barrière hémato-encéphalique et l'hétérogénéité structurelle du cerveau limitent fortement la délivrance ciblée des médicaments, des approches alternatives comme la pharmacologie intracrânienne, ouvrent des perspectives prometteuses. Cependant, ces méthodes restent passives : la diffusion de médicament n'est ni dosable ni contrôlable dans le temps, ce qui limite leur efficacité clinique. Parallèlement, les nanotechnologies offrent des vecteurs stables et polyvalents, capables d'encapsuler et transporter efficacement divers agents thérapeutiques mais elles ne permettent pas, à elles seules, une délivrance localisée et déclenchée à la demande. Notre approche répond à ces limites en développant des polymersomes photoactivables capables de libérer leur contenu de manière localisée sous l'effet de la lumière.

Mes travaux reposent sur trois axes principaux : (i) la conception des polymersomes photoactivables et biocompatibles ; (ii) l'évaluation de leur innocuité afin d'assurer une utilisation sûre et efficace au niveau du tissu cérébral ; (iii) la démonstration d'une photolibération efficace de molécules actives dans des circuits neuronaux.

Nos travaux ont confirmé que le procédé d'émulsion-centrifugation constitue une méthode adaptée pour obtenir un rendement élevé de polymersomes photoactivables de taille micrométrique (diamètre moyen de 8.27 ± 0.14 µm), capables d'une libération rapide et localisée de leur contenu, avec un temps de rupture moyen de 6.39 ± 0.90 s. La biocompatibilité et la capacité de libération de ces polymersomes ont été évaluées *in vitro* sur des cultures primaires corticales murines. Ni l'illumination à 470 nm (fibre optique Ø 400 µm, NA 0.5, 20 s), ni l'incubation avec des polymersomes à des concentrations croissantes (0.6 à 9.10^3 polymersomes/puits), ni l'association des deux n'ont affecté la viabilité cellulaire. La tolérance *in vivo* a été confirmée par l'injection des polymersomes dans le cerveau de souris et l'analyse de la réactivité gliale par immunomarquage des protéines IBA-1 et GFAP à 48 heures et 3 semaines après injection. Les polymersomes n'ont provoqué aucune réaction gliale au-delà de l'effet de l'injection stéréotaxique elle-même, démontrant que les polymersomes et leur photoactivation sont bien tolérés par les cellules et les tissus cérébraux. Afin de démontrer l'efficacité de la photolibération dans le tissu et de quantifier sa capacité à moduler les processus neuronaux, nous avons mis au point un protocole fondé sur la mesure de l'activité neuronale. Des enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés sur des coupes de cerveau de souris préservant la connexion synaptique entre les régions CA3 et CA1 de l'hippocampe, une zone clé impliquée dans les processus de mémorisation. Grâce à l'encapsulation puis la photolibération du CNQX (100 µM), un antagoniste compétitif des récepteurs AMPA/kaïnate, nous avons démontré que les polymersomes agissent comme des réservoirs à la demande, permettant une administration prolongée de médicaments et localisée autour du site d'injection.

En conclusion, les polymersomes photoactivables constituent un outil prometteur pour l'étude des mécanismes cérébraux et le développement de stratégies thérapeutiques innovantes. Leur potentiel est actuellement évalué *in vivo* dans un modèle murin de glioblastome, pour la libération ciblée de CNQX, afin de limiter l'invasion tumorale.

Mots-clés : polymersomes, délivrance ciblée de molécules, photostimulation, cerveau