



Administration par voie intranasale de nanoformulations pour une délivrance du nez au cerveau

Marie Bolon

► To cite this version:

Marie Bolon. Administration par voie intranasale de nanoformulations pour une délivrance du nez au cerveau. Ingénierie biomédicale. Université Claude Bernard - Lyon I, 2025. Français. <NNT : 2025LYO10165>. <tel-05374891>

HAL Id: tel-05374891

<https://theses.hal.science/tel-05374891v1>

Submitted on 20 Nov 2025

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

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



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 - Attribution - Non-commercial use - No
Derivative Works - International License

**THÈSE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1**

**École Doctorale n°205
École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé**

Discipline : Ingénierie Biomédicale

Soutenue publiquement le 23/09/2025, par :
Marie Bolon

**Administration par voie intranasale de
nanoformulations pour une délivrance
du nez au cerveau**

Devant le jury composé de :

Pre. Clayer-Montembault, Alexandra	PU – Université Claude Bernard Lyon 1	Présidente
Pr. Ponchel, Gilles	PU – Université Paris-Saclay	Rapporteur
Dre. Sancey, Lucie	DR – CNRS, IAB UMR 5309	Rapportrice
Pr. Corvis, Yohann	PU – Université Paris Cité	Examineur
Pr. Trembleau, Alain	PU – Université Paris Sorbonne	Examineur
Dre. Monge, Claire	CR – CNRS, LBTI UMR 5305	Directrice de thèse
Dre. Richard, Sophie	MCU – Université Claude Bernard Lyon 1	Co-encadrante de thèse
Dr. Fieux, Maxime	PH – Hospices Civils de Lyon	Co-encadrant de thèse



Ces travaux s'intègrent dans le cadre de l'appel à projet SENS 2022 de l'Université Claude Bernard Lyon 1. Ils ont été réalisés au sein du Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie thérapeutique (UMR 5305 – 7, passage du Vercors), à Lyon.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier la Dre. Claire Monge, la Dre. Sophie Richard et le Dr. Maxime Fieux de m'avoir encadrée lors de cette thèse. **Claire**, merci d'avoir dirigé cette thèse et de nous avoir guidés scientifiquement. Je te remercie pour l'oreille attentive que tu as été et surtout pour m'avoir toujours laissée m'exprimer aussi librement que j'ai pu le faire pendant ces trois années. **Maxime**, merci pour ton soutien, tes précieux conseils et toutes les idées que tu as pu apporter au projet. Enfin, **Sophie**, merci infiniment d'avoir misé sur moi et de m'avoir fait confiance pour ce projet. Merci pour ton soutien et ta patience face à mon impatience. Au-delà de m'avoir encadrée et d'avoir porté ce projet avec moi, tu as su me laisser être autonome sans pour autant me laisser seule. Ces trois années ont été incroyables sur bien des aspects et tu y es largement pour quelque chose. Je finirai ces quelques mots par te remercier également pour avoir été là pour moi personnellement aussi, pour ces petits cocktails, pour le restaurant pour fêter mes 30 ans, merci d'avoir été présente, pour moi et pour les personnes auxquelles je tiens.

Je remercie les membres de mon jury de thèse. Merci à la Dre. **Lucie Sancey** et au Pr. **Gilles Ponchel** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Merci également au Pr. **Yohann Corvis** et au Pr. **Alain Trembleau** d'avoir accepté d'examiner ces travaux. Je souhaiterais remercier plus particulièrement la Pre. **Alexandra Clayer-Montembault** d'avoir présidé ce jury mais aussi d'avoir participé à mon comité de suivi de thèse au cours de ces trois années. Merci du temps que tu m'as accordé et de toutes les discussions que nous avons pu avoir. Enfin, je remercie le Dr. **Nicolas Meunier** d'avoir également participé à mon comité de suivi de thèse mais aussi de m'avoir accueillie une semaine dans son laboratoire (merci également au reste de l'équipe VIM pour leur accueil). Merci pour les discussions que nous avons pu avoir au cours de ces trois ans et pour m'avoir aidée pour la partie immunofluorescence de ce projet.

Je souhaite remercier les anciens et les membres actuels de l'**équipe Nanovec** et plus particulièrement les membres de notre bureau. **Pierre**, ton langage fleuri au quotidien nous aura au moins permis d'en apprendre plus sur la langue française. Merci de nous avoir laissés t'embêter avec tes expressions qui sont indissociables de ta personne, merci d'avoir toujours trouvé le temps de m'aider, notamment pour la gestion des déchets, des dysfonctionnements du Rotavap, ou des petits problèmes divers et variés du quotidien du laboratoire. Merci pour ton soutien, ton écoute et ta patience, merci également d'avoir eu toutes les bonnes réponses au blind test même si on n'est arrivé que deuxième et enfin merci d'avoir supporté nos petites blagues pas très fines, nos modifications de l'agencement des meubles et d'avoir grandement

participé à la peinture du bureau ! **Arthur**, troisième mousquetaire de ce bureau de la toxicité positive, merci pour nos discussions quotidiennes, pour nos séances de sport, pour ton aide pour déterminer quel graphique serait le plus parlant, quel test statistique serait le plus pertinent et surtout de m'avoir écoutée me demander pour la millième fois si ce n'est pas mieux d'utiliser la SD ou le SEM. Merci d'avoir toujours cherché l'info, même si on parlait de quelque chose de très peu important, merci pour le pédantisme et pour la sortie escalade. Merci pour ton implication pour les résultats au CT scan presque aussi importante que celle pour l'organisation des afterworks. Enfin, merci également pour la machine à café à grain (que je ne verrai probablement jamais !!).

Je souhaiterais remercier également **Renaud** et **Cynthia** pour m'avoir aidée et soutenue moralement pour les manip souris. Merci en particulier à Cynthia pour m'avoir trouvé quelques souris de réforme pour les entraînements, pour avoir participé activement à la vie du laboratoire hors du laboratoire et pour nos petites discussions potins, malheureusement pas très croustillants. Merci également à **Élise**, pour ton écoute, ta bonne humeur et tes bons conseils sur le pilates. Merci à **Céline** pour ton soutien au labo, notamment les commandes et pour cette journée très sympa chez toi. Merci aussi pour ton œil de lynx lors de la relecture de ce manuscrit. Merci également à **Alicia** pour son aide précieuse dans la dernière ligne droite et notamment pour les résultats de cytométrie. Merci à **Jean-Paul** pour son sourire, son écoute et son infinie gentillesse.

Je voudrais également remercier **Morgane** et **Audrey** d'avoir accepté de travailler avec moi lors de leurs stages de fin d'étude. Merci pour votre sérieux et toute l'aide que vous m'avez apportée.

Enfin, je souhaiterais remercier **Laurent**. Merci beaucoup pour tes commentaires très peu sarcastiques quasi quotidiens, merci d'avoir toujours su trouver le petit mot pour me faire me sentir mieux, pour m'élever, pour me mettre du baume au cœur, pour me remonter le moral. Merci pour ton honnêteté, ta clairvoyance et ta demi-mesure. Plus sérieusement, ça a été un réel plaisir de passer ces trois ans à tes côtés au labo, d'avoir écouté tes nombreuses anecdotes sur tes chats et d'avoir participé à tes barbecues à Duerne !

J'aimerais remercier l'ensemble des doctorants du LBTI pour tous les moments de convivialité qu'on a pu partager : **Camille, Valentine, Kardelen, Magaly, Sarah, Laurie, Chloé, Manon, Samuel, Céline, Alicia, Fanny** et plus particulièrement, **Emma, Justine et Lucile** pour cette formation expé animale qui n'aurait pas du tout été la même sans vous.

Enfin, pour leur soutien qui ne date pas d'hier, et parce que je n'en serais pas là aujourd'hui si je n'étais pas incroyablement bien entourée, je souhaiterais remercier ma famille, vous êtes

ma plus grande fierté et mes fondations les plus solides. **Papa et Maman**, merci pour votre patience, vos encouragements constants et votre soutien sans faille. Merci d'avoir cru en moi-même quand je n'y croyais plus. **Baptiste et Emma**, merci pour votre présence et votre soutien, merci de traverser la France ou l'océan Atlantique pour répondre présents, depuis toujours et pour toujours.

Je voudrais également remercier mes grands-parents, **Papy et Mamie, Mamizoune et Jacques**, pour leur soutien, pour leur présence à mes côtés, pour leurs messages d'encouragements à chaque échéance, pour leur foi en moi et en ce que je suis capable d'accomplir. Je suis si heureuse de vous rendre fiers à chaque instant.

Je remercie mes oncles et tantes pour leur soutien et les bons moments partagés en famille. Je remercie particulièrement Parrain et Alexia de m'avoir entourée et de m'entourer d'amour constant. **Parrain**, merci de m'avoir accueillie à Amiens et de m'avoir fait passer d'excellentes soirées lyonnaises, merci surtout pour cet après-midi d'avril 2020, quand tu es venu me voir et me soutenir après le départ de Jacques, ce sont des moments que je n'oublierai jamais. **Alexia**, tu ne liras jamais ces mots mais je sais que là où tu es, tu sais à quel point je suis reconnaissante de t'avoir eu à mes côtés et d'avoir tes enfants dans ma vie. J'ai hâte de faire ce voyage en Australie qu'on aurait dû faire ensemble et d'aller voir ta famille au pays des kangourous (même si j'ai extrêmement peur des araignées !).

Je souhaiterais aussi exprimer mon infinie gratitude à **Magali**, merci d'avoir été là, ce roc qui maintient cette famille si unie. Merci de m'avoir invitée à tous ces repas, même si parfois j'ai dû aussi faire à manger et aider pour les devoirs ! Merci de m'inviter continuellement à fêter les anniversaires de tes enfants, merci d'avoir recueilli ma voiture quand la vitre était cassée, merci pour le concert des Enfoirés, celui d'Angèle, ceux de la Star Ac', pour le tournoi de tennis à Paris et tous ces moments du quotidien qu'on a pu partager.

Je vais aussi remercier mes cousins et mes cousines. Merci en particulier à Thomas, Clotilde, Margot et Éloïse de m'avoir supportée et de vouloir encore passer des moments avec moi. Merci pour toutes les vacances à Vieu, les baignades au lac ou à la piscine, l'accrobranche, les tentatives de running dans la vie du loup, Babysitting 1 et 2, et bien d'autres. **Clotilde**, merci pour tes messages vocaux au quotidien, je suis si heureuse de faire autant partie de ta vie et je suis extrêmement fière de la personne que tu es et que tu deviens. Je suis incroyablement chanceuse de te voir évoluer et réussir. **Margot**, ma petit Migot, tu es une personne d'une gentillesse infinie et tu es et tu resteras la best à mes yeux, même si je dois te le rappeler tous les jours. Il y a des moments qu'on a vécus toutes les deux que je n'oublierai jamais, ces moments quand on a regardé Pékin Express toutes les deux (regard bizarre), nos « Je t'aime

pas je t'adore », les câlins beaucoup trop serrés, nos « Je te promets », et bien d'autres délires que nous avons... Je te promets d'être à tes côtés, pour toujours. Et enfin, **Éloïse**, merci de m'emmener à tous les concerts et les événements auxquels tu vas. Merci pour ces moments où tu rageais, surtout quand je voulais te brosser les cheveux. Merci notre check qu'on n'assume pas (Paillettes, cheval...), nos Tiktoks qui commencent à dater, pour cette séance de cinéma (Pierre Lapin) et pour les moments de rire qu'on a eu surtout au lac du Bourget, quand tu avais peur des requins !

Morane (Dre. Houd plutôt !), les mots ne seront jamais assez pour décrire ma reconnaissance de t'avoir dans ma vie. Nous nous sommes rencontrées au moment où je me sentais au mauvais endroit, où mon futur ne ressemblait plus du tout à ce qui était prévu et où tout ce que j'avais imaginé pour moi avait volé en éclats. Et puis tu étais là, devant moi, à vivre la même chose que moi, à comprendre exactement ce que je pouvais ressentir. Tu es la définition même de l'amitié, cette personne qui apporte son soutien infaillible, son écoute sans jugement, qui est à la fois l'épaule sur laquelle se reposer, la main tendue, les bras qui serrent et qui résolvent au moins la moitié du problème, l'oreille qui est prête à tout entendre, bref cette personne qui est là, juste là, constamment là. Merci d'avoir compris, de m'avoir comprise, de m'avoir aidée à me relever, et de partager autant de chose avec moi. L'entièreté de nos souvenirs pourrait faire une thèse entière, avec entre autres ce cours de virologie où on a fait du collage, pliage et découpage, mon mime de bactérie en solution (extrêmement bien réussi en toute objectivité) en TP (devant les profs), cet écrasement si violent d'une araignée si microscopique (devant ces mêmes profs), cette sortie pédalo pendant les révisions, nos courses au parc de la Tête d'Or (les Moniques étaient de sortie), les cafés-cookies à Patio, cette soirée de Noël à regarder the Holiday, La Pierre, chez mes grands-parents, Montpellier, Lyon, Ed Sheeran, les balades pendant le confinement, les repas chez tes parents, ces sushis au Parc de la Tête d'Or pour se raconter tout ce qu'on avait vécu, tous ces appels Skype et ces moments de retrouvailles, tous les souvenirs que j'oublie et surtout tous les souvenirs à venir. Tu es mon pilier, ma force et ma personne (pour citer Grey's Anatomy). Quand je vois ce que ces 10 dernières années nous ont fait vivre et à quel point on a évolué et grandi, j'ai hâte de voir ce que les 10 prochaines vont nous offrir. A nous, à nos 10 ans, à nos thèses et à notre futur.

Camille, pour citer une auteure reconnue du XXI^{ème} siècle, on a tous besoin d'une Camille Ayad dans sa vie, et par chance, tu es entrée dans la mienne. Ces quelques lignes ne rendront pas justice à notre amitié que le temps n'impacte pas. Qui aurait cru que ce LBTI était un lieu de rencontres incroyables ! Merci d'être présente à mes côtés depuis ce stage de M2, merci pour ton écoute, pour ton soutien, pour ton infinie gentillesse et ton cœur grand comme ça. Tu es une personne unique, si belle (physiquement et mentalement bien sûr), une force de la

nature, la résilience incarnée et une source de motivation (qui aurait pu motiver Pierre et Jean Paul à déplacer un sommier un vendredi aprèm à part toi ?!). Merci pour tout, tout ce qu'on a vécu ces dernières années, même le pire, car c'est souvent au plus bas, qu'on se rend compte des gens qui nous aideront à atteindre le plus haut. Merci pour ces innombrables fous rires, pour Lady Smith, pour le sérum phy, pour Clic Clic en sortant de la douche, pour ce moment sous une pluie battante en Italie, merci de t'énerver sur les Démons de Minuit (oui, on dit Qui ça, qui ça ?). J'ai hâte de voir ce que l'avenir te réserve. Te remercier ne va pas sans remercier **Audrey**, ma blonde, ma team FMG, ma petite tête que j'ai eu en face pendant 6 mois et qui me manque au labo. Merci pour tout, merci d'avoir été là, notamment quand les choses ne se sont pas passées comme prévu... Camille & Audrey, merci de m'avoir poussée, de m'avoir redonné l'envie, l'envie de manger, l'envie d'essayer, l'envie de sortir de ma zone de confort, bref l'envie de vivre pleinement, vous faites la personne que je suis aujourd'hui. Merci pour Madrid (les sangrias, c'est maintenant ou Jamòn), merci pour les vacances à la Seyne sur Mer et votre mal de mer sur une bouée, cette épopée à Val-Thorens, ces soirées notamment à base de Margaritas ou de punch pas très bon, ces moments de vie tout simplement...

Je finirai par remercier les amis plus récents, **Jérémy et Léna**, merci pour ces soirées, films, ciné, Deliveroo ou Au Bureau, vous avez été d'un soutien important et vous m'avez permis de me changer les idées quand j'en avais vraiment besoin. **Eddy, Calou, Guillaume, Delphine, Damien, Raphy, Flo et les autres**, merci de m'avoir accueillie les bras ouverts, merci pour les moments qu'on passe tous ensemble, les vacances au ski, les vacances au soleil, les anniversaires des uns et des autres. Merci d'avoir pris de mes nouvelles, d'avoir fait attention à moi, merci de m'avoir considérée comme une de vos amies depuis le premier jour. Un merci à **Manon**, pour tous ses sourires qui font arrêter la Terre de tourner, et à **Elia**, qui illumine nos moments par sa joie et son énergie.

Enfin, **Renaud**, merci pour TOUT ! Tu es l'ancre qui m'empêche de dériver, tu es le gouvernail qui m'aide à me guider, tu es la crique qui me protège, tu es la bouée qui m'évite de couler, tu es le vent dans mes voiles, le courant sous ma coque et mon phare dans la nuit. Merci pour tout ce que tu es, pour ton soutien, pour ton humour, pour me faire toujours rire même si parfois je ris de tes blagues un peu ratées, pour ton amour et pour notre petite famille avec Plume. Merci de prendre soin d'elle et de moi, merci pour ta patience, ton écoute, pour me faire voir le verre à moitié plein plutôt qu'à moitié vide, merci pour la vie que tu nous offres et pour le bonheur que tu m'apportes au quotidien.

Résumé

Les maladies du cerveau sont un enjeu majeur de santé publique. Les difficultés de leurs traitements reposent sur la faible biodistribution cérébrale des médicaments due à la présence de barrières physiologiques comme la muqueuse intestinale, le métabolisme hépatique, et la barrière hématoencéphalique. Dans ce contexte, la voie intranasale (IN) offre une voie d'accès rapide et directe au cerveau. Cependant, certains processus biologiques, tels que la clairance mucociliaire, le mucus ou les enzymes, peuvent limiter l'accès du médicament à la muqueuse et donc au cerveau. Les nanoparticules (NPs), et notamment les NPs polymériques, apparaissent comme un outil de délivrance du médicament, biocompatible, capable de protéger le principe actif et de le libérer au niveau de son site d'action.

Ce projet de thèse s'inscrit dans l'optique de développer une plateforme de délivrance de médicaments et d'agents d'imagerie pour une administration du nez au cerveau (ANC). La première partie du projet a consisté à développer cet outil de délivrance, des NPs composées d'acide polylactique et de poloxamère. Nous avons comparé deux poloxamères, deux types de synthèse et plusieurs concentrations en poloxamères afin de sélectionner la formulation optimale. Grâce à l'encapsulation d'un fluorochrome, nous avons pu localiser les NPs dans le bulbe olfactif des souris après administration IN. Ces résultats encourageants nous ont poussés à tester le potentiel de nos NPs à véhiculer un principe actif. Nous avons donc adsorbé un peptide bloquant (BP) capable de cibler les oligomères de la protéine bêta-amyloïde neurotoxique, principale cause de la maladie d'Alzheimer. Nous avons prouvé que le BP conservait son activité thérapeutique une fois à la surface des NPs et que ces dernières protégeaient le BP de la dégradation. Enfin, nous avons encapsulé une ou plusieurs molécules anticancéreuses ainsi qu'un agent de contraste aux rayons X. Nous avons pu d'une part visualiser les NPs dans la tête des souris grâce à la tomographie à rayons X et d'autre part, nous avons montré l'activité thérapeutique des NPs sur les tumeurs cérébrales chez la souris.

En résumé, nous avons réussi à montrer que nos NPs pouvaient accéder au cerveau après une administration IN et pouvaient également avoir un effet thérapeutique. La suite de ce projet serait de comprendre quel chemin exact est emprunté par les NPs pour atteindre le cerveau mais également quel paramètre permettrait de moduler la voie empruntée et de comprendre comment l'utilisation d'un agent de ciblage pourrait nous permettre d'améliorer encore plus le traitement des pathologies cérébrales.

Mots-clés : administration intranasale, nanoparticules, polymères, imagerie, Alzheimer, glioblastome

Summary

Brain diseases represent a major public health challenge. Obstacles to their treatments lie in the limited brain bioavailability of drugs, mainly due to numerous physiological barriers such as the intestinal mucosa, hepatic metabolism, and, mostly, the highly selective blood-brain barrier. In this context, the intranasal (IN) administration offers a promising alternative by providing a rapid and direct connection of the nasal cavity, the olfactory bulbs, and the brain. However, several biological processes within the nasal cavity, including the presence of mucus, the mucociliary clearance, and the enzymes, can limit the drug access to the mucosa and consequently to the brain. Nanoparticles (NPs), and more specifically polymeric NPs, have emerged as a promising drug delivery system, due to their biocompatibility, their ability to encapsulate the active molecule and release it at the desired site of action.

The aim of this project was to develop a delivery system for drugs and/or imaging agents for the nose-to-brain delivery. The first part focussed on the development of this drug delivery system, based on polymeric NPs composed of polylactic acid and of poloxamers (P188 or P407). We compared the two poloxamers, two synthesis methods, and different poloxamers concentrations to finally determine the optimal concentration. By encapsulating a fluorochrome, we were able to locate NPs in the olfactory bulb of mice following IN administration. These encouraging results lead us to evaluate the potential of our NPs to deliver an active drug. Secondly, we adsorbed a blocking peptide (BP) targeting beta-amyloid oligomers, which are highly toxic and responsible for the Alzheimer's disease. We demonstrated that the BP remained active once absorbed at the NP surface but also that NPs effectively protected the BP against enzymatic degradation. Finally, we encapsulated an anti-cancer drug along with an X-ray contrast agent. Using X-ray computed tomography, we confirmed the presence of NPs in the mice head after IN administration. Then, we demonstrated that our NPs had a therapeutic effect on the brain tumour of a glioblastoma mouse model.

In summary, our polymeric NPs could reach the brain after IN administration and also have a therapeutic effect. The next step in this project will be to understand not only the exact pathway taken by the NPs to reach the brain, but also parameters that could modulate the NPs transport, and how the use of a targeting agent could allow to further improve the treatment of brain disorders.

Keywords : intranasal administration intranasale, nanoparticles, polymers, imaging, Alzheimer, glioblastoma

Table des matières

Remerciements	3
Résumé.....	8
Table des matières	10
Liste des figures	15
Liste des tableaux	18
Liste des abréviations.....	19
Caractéristiques et évaluation des nanoparticules polymériques pour une administration efficace du nez au cerveau	21
I. Administration au cerveau par la voie nasale.....	24
A. Inconvénients des différentes voies d'administration.....	24
B. Anatomie de la cavité nasale	26
C. Différentes voies d'accès du nez au cerveau	28
D. Avantages de la voie nasale	29
E. Verrous scientifiques liés à l'administration intranasale	29
1. Mucus	29
2. Clairance mucociliaire	30
3. Enzymes	31
4. Dispositif d'administration	31
II. Utilisation des nanoparticules	32
A. Différents types de nanoparticules.....	32
1. Liposomes et nanoparticules lipidiques.....	32
2. Nanoparticules inorganiques	33
3. Nanoparticules à base de polymères.....	34
B. Polymères comme brique centrale de la nanoparticule.....	35
1. Chitosan	Erreur ! Signet non défini.
2. Acide polylactique co-glycolique (PLGA)	37
3. Acide polylactique.....	38
4. Autres types de polymères	39
C. Fonctionnalisation des nanoparticules polymériques.....	40
1. Amélioration de la stabilité et de la furtivité	40
2. Mucoadhésion	43
3. Mucopénétration	44
4. Amélioration de la perméation	45

D.	Caractéristiques physicochimiques.....	47
1.	Taille des nanoparticules.....	47
2.	Charge des nanoparticules.....	48
III.	Intérêt des nanoparticules polymériques dans le traitement des maladies du système nerveux central et leur évaluation.....	50
A.	Évaluation <i>in vitro</i>	50
1.	Types cellulaires	50
2.	Modèles <i>in vitro</i> et de cocultures	51
B.	Évaluation <i>ex vivo</i>	52
1.	Modèles <i>ex vivo</i>	53
2.	Cellule de diffusion	55
3.	Adhésion et pénétration de la muqueuse nasale	55
4.	Intégrité de la muqueuse nasale.....	55
C.	Évaluation <i>in vivo</i>	56
1.	Modèles animaux et anatomie de la cavité nasale	56
2.	Administration	57
3.	Évaluation de la toxicité	58
4.	Étude de la pharmacocinétique	58
5.	Étude de la pharmacodynamique.....	60
IV.	Les maladies du cerveau.....	61
V.	Conclusion.....	62
	Développement de nanoparticules d'acide polylactique et de poloxamère pour la délivrance du nez au cerveau	71
I.	Synthèse des différents types de nanoparticules.....	75
A.	Synthèse des nanoparticules d'acide polylactique	75
B.	Synthèse des nanoparticules d'acide polylactique et de poloxamères	77
II.	Caractérisations physicochimiques.....	85
A.	Stabilité des nanoparticules.....	85
1.	Des nanoparticules stables dans le temps	85
2.	Des nanoparticules stables dans les milieux biologiques	87
B.	Modélisation moléculaire des assemblages polymériques	88
III.	Évaluation <i>in vitro</i>	91
A.	Différents types cellulaires.....	91
B.	Viabilité cellulaire.....	93
C.	Internalisation par les cellules de la muqueuse nasale	95

IV. Évaluation in vivo du passage nez/cerveau	99
A. Étude de la biodistribution des nanoparticules	99
B. Visualisation des nanoparticules dans la cavité nasale et le bulbe olfactif	102
V. Discussion et conclusion	106
Nanoparticules contre la maladie d'Alzheimer	111
I. Cible thérapeutique	113
A. La maladie d'Alzheimer	113
B. Action du peptide bloquant	115
II. Fonctionnalisation avec un peptide thérapeutique	115
III. Évaluation in vitro	119
A. Stabilité de l'interaction entre le peptide bloquant et la nanoparticule	119
B. Activité du peptide bloquant	119
1. Interaction entre le peptide bloquant et la protéine A β et activité anti-amyloïde	119
2. Protection contre la dégradation	121
C. Viabilité cellulaire en présence du peptide bloquant	122
D. Internalisation par les cellules	123
IV. Évaluation in vivo	124
A. Biodistribution	124
B. Transparisation	126
C. Kratoscope	127
D. Immunohistochimie	128
V. Discussion et conclusion	129
Nanoparticules pour une approche combinée diagnostic-thérapeutique	133
I. Nanoparticules contrastantes et anticancéreuses	135
A. Les nanoparticules comme outils théranostiques contre les cancers	135
B. L'hafnium comme agent de contraste pour l'imagerie aux rayons X	136
C. Les cancers du cerveau	137
D. De nouvelles molécules contre le glioblastome	137
II. Des nanoparticules contenant de l'oxyde d'hafnium et des molécules anticancéreuses	138

A.	Synthèse des nanoparticules avec de l'oxyde d'hafnium	138
B.	Synthèses avec les molécules anticancéreuses et l'hafnium	139
III.	Évaluation in vitro et in vivo.....	140
A.	Microscopie électronique à transmission	140
B.	Tests sur les cellules.....	140
C.	Imagerie aux rayons X.....	141
D.	Évaluation de l'effet thérapeutique	145
IV.	Discussion et perspectives	147
	DISCUSSION GENERALE	149
I.	Résumé des résultats obtenus.....	151
II.	Formulation universelle ciblée : une idée utopique.....	153
III.	Mécanismes de passage du nez au cerveau	154
IV.	Évaluation in vitro complexe	155
V.	Limites de l'administration in vivo.....	157
VI.	Problématique de la translation clinique.....	158
	MATERIEL ET METHODES.....	161
I.	Synthèses des nanoparticules	163
A.	Synthèse des NP-PLA	163
B.	Synthèse des NP PLA Polox (hybrides et couronnes)	163
C.	Synthèse des nanoparticules fluorescentes	163
D.	Synthèse des nanoparticules contenant de l'hafnium	164
E.	Synthèses des NP-HfO ₂ avec les molécules anticancéreuses	164
F.	Adsorption du peptide bloquant sur les nanoparticules	165
II.	Caractérisation physicochimique des nanoparticules.....	165
A.	Diamètre hydrodynamique et charge de surface.....	165
B.	Détermination de la concentration.....	165
1.	Par la diffusion dynamique de la lumière	165
2.	Par le taux de solide	166
C.	Modélisation moléculaire	166
D.	Étude de la stabilité des nanoparticules	168

E.	Microscopie électronique à transmission	168
F.	Évaluation de l'adsorption du peptide bloquant sur les nanoparticules	168
III.	Évaluation in vitro	169
A.	Évaluation de l'activité du peptide bloquant.....	169
B.	Dégradation du peptide bloquant	170
C.	Cellules	170
D.	Viabilité cellulaire.....	171
E.	Internalisation des nanoparticules par les cellules	171
1.	Microscopie confocale	171
2.	Cytométrie en flux	172
IV.	Évaluation in vivo	172
A.	Animaux	172
B.	Biodistribution	173
1.	Évaluation en fluorescence	173
2.	Transparisation	173
3.	Tomodensitométrie	174
C.	Coupes de cavités nasales.....	175
1.	Immunohistochimie des cavités nasales.....	175
2.	Kratoscope	176
D.	Évaluation pharmacodynamique.....	176
V.	Statistiques	177
	ANNEXES	179
	BIBLIOGRAPHIE.....	183

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la BHE.....	25
Figure 2 : Les différents épithéliums de la cavité nasale et les voies d'accès au cerveau.....	26
Figure 3 : Exemples de types de NPs utilisées pour l'ANC.....	32
Figure 4 : Différents polymères peuvent être utilisés pour constituer le cœur de la NP pour l'ANC.....	36
Figure 5 : Polymères comme structure de base des NPs utilisées pour l'ANC.....	39
Figure 6 : Fonctionnalisation des NPs polymériques pour l'ANC.....	47
Figure 7 : Caractéristiques des NPs utilisées pour l'ANC, en termes de diamètre et de charge, obtenues d'après les informations trouvées dans 88 articles différents.....	49
Figure 8 : Évaluation in vitro des formulations pour l'ANC.....	50
Figure 9 : Évaluation ex vivo des formulations pour l'ANC.....	53
Figure 10 : Protocole de culture d'organoïdes de la muqueuse olfactive (167).....	54
Figure 11 : Évaluation in vivo des formulations pour l'ANC.....	56
Figure 12 : Schéma du poloxamère P188 avec ses différents blocs de poly(oxyde d'éthylène) (POE) hydrophiles et de poly(oxyde de propylène) (POP) hydrophobes (251).....	74
Figure 13 : Évolution de la pression lors de l'évaporation des solvants à 30°C et 150 rpm pour la synthèse des NP-PLA.....	76
Figure 14 : Mesure du diamètre des NPs contenant différentes concentrations de poloxamère P188 ou P407 ...	78
Figure 15 : Mesure du PDI des NPs contenant différentes concentrations de poloxamère P188 ou P407	79
Figure 16 : Mesure de la charge des NPs contenant différentes concentrations de poloxamère P188 ou P407 ...	80
Figure 17 : Taux de solide des NPs contenant différentes concentrations de poloxamère P188 ou P407	81
Figure 18 : Concentration des NPs en fonction du poloxamère utilisé ou du type de synthèse.....	82
Figure 19 : Comparaison des méthodes de mesure de la concentration des NPs, la concentration a été mesurée par pesée grâce au taux de solide ou bien par diffusion dynamique de la lumière.....	83
Figure 20 : Évaluation du taux de solide dans le surnageant des NPs.....	84
Figure 21 : Caractérisation des NPs après dialyse en eau ou centrifugation-suspension en eau.....	85
Figure 22 : Stabilité du diamètre, du PDI et de la charge des NP-PLA au cours du temps lorsqu'elles sont conservées à 4°C.....	86
Figure 23 : Stabilité des NPs contenant du poloxamère au cours du temps.....	86
Figure 24 : Stabilité du diamètre (A), de l'homogénéité (B) et de la charge (C) des NPs après dilution dans du mucus artificiel.....	87
Figure 25 : Stabilité du diamètre (A), de l'homogénéité (B) et de la charge (C) des NPs après dilution dans du LCR artificiel.....	88
Figure 26 : Représentation schématique des différentes billes utilisées pour les calculs de DPD (A) en se basant sur les formules chimiques des molécules (B)	89
Figure 27 : Représentation des NPs formées grâce à la méthode de DPD.	90
Figure 28 : Différenciation des cellules PC12 observées au microscope optique (A : J0, B : J2 et C : J6).....	91
Figure 29 : Culture ALI des RPMI 2650. Images au microscope suite à un marquage par immunofluorescence des cultures de RPMI 2650 à l'interface air-liquide (A).	93
Figure 30 : Viabilité des cellules RPMI 2650 après 24 h d'incubation avec les différentes NPs.....	94
Figure 31 : Viabilité des cellules PC12 différenciées après 24 h d'incubation avec les différentes NPs	94

Figure 32 : Évaluation par la cytométrie en flux de l'internalisation des NPs fluorescentes par les RPMI 2650 après 1 h ou 3 h d'incubation.	96
Figure 33 : Évaluation par cytométrie en flux de l'internalisation des NPs fluorescentes par les PC12 différenciées après 1 h ou 3 h d'incubation.	97
Figure 34 : Évaluation en microscopie à fluorescence de l'internalisation des NPs fluorescentes par les RPMI 2650 après 1 h ou 3 h de contact avec les NP-PLA (A), les NP-PLA-P188 (B), les NP-PLA-P407 (C), les NP-PLA-cP188 (D) ou les NP-PLA-cP407 (E).	98
Figure 35 : Évaluation en microscopie à fluorescence de l'internalisation des NPs fluorescentes par les PC12 différenciées après 1 h ou 3 h de contact avec les NP-PLA (A), les NP-PLA-P188 (B), les NP-PLA-P407 (C), les NP-PLA-cP188 (D) ou les NP-PLA-cP407 (E).	98
Figure 36 : Image de fluorescence des souris après administration IN des NPs encapsulant le DiR (n=4)	101
Figure 37 : Quantification avec Fiji de la fluorescence dans la souris, après administration IN des nanoformulations, au cours du temps.....	101
Figure 38 : Quantification de la fluorescence dans le cerveau des souris, 3 h après administration IN, par rapport à la fluorescence administrée.....	102
Figure 39 : Schéma et coupes histologiques de la cavité nasale de souris n'ayant reçu aucun traitement.....	103
Figure 40 : Coupes histologiques de la cavité nasale de souris 1 h après administration IN de NPs fluorescentes (DY650, en rouge).....	104
Figure 41 : Coupes histologiques de la cavité nasale de souris 3 h après administration IN de NPs fluorescentes (DY650, en rouge).....	105
Figure 42 : Quantification du nombre de NPs par image du bulbe olfactif de souris 1 h et 3 h après administration IN de NPs fluorescentes	106
Figure 43 : Adsorption du BP sur des NPs de PLA-poloxamère synthétisées avec les deux types de synthèse et avec les deux types de poloxamère.	118
Figure 44 : Caractéristiques des NPs avec ou sans le BP mesurées grâce à la DLS et la mobilité électrophorétique	118
Figure 45 : Stabilité des NP-PLA-P188-BP lors de leur conservation à 4°C	119
Figure 46 : Évaluation de l'interaction entre la protéine A β et le BP une fois adsorbé sur les NPs composées d'un mix de PLA et de poloxamère 188 (H pour hybrides) et les NPs recouvertes de poloxamère 188 (C pour couronne) (n=1).	120
Figure 47 : Quantification des différents oligomères d'A β en présence de différentes formulations.....	121
Figure 48 : Dégradation du bBP couplé ou non aux NPs sur Dot Blot en présence de milieu de culture de cellules iPS différenciées en neurones à deux concentrations différentes.....	122
Figure 49 : Évaluation de la viabilité des cellules épithéliales nasales RPMI 2650 (A) et des cellules neuronales différenciées PC12 (B) après 24 h de contact les NP-PLA-P188 ou les NP-PLA-P188-BP.....	123
Figure 50 : Évaluation de l'internalisation des NP-PLA-P188 et des NP-PLA-P188-BP fluorescentes par les RPMI 2650 et les PC12 différenciées après 1 h ou 3 h d'incubation.	124
Figure 51 : Biodistribution des NP-PLA-P188-BP en des NP-PLA-P188 chez la souris.	125
Figure 52 : Observation des cerveaux rendus transparents de souris ayant reçu des NP-PLA-P188 ou des NP-PLA-P188-BP fluorescentes (DY650) par voie IN (n=1).....	126
Figure 53 : Coupes de cavités nasales de souris naïve ou ayant reçu des NP-PLA-P188-BP fluorescentes par voie IN, observées grâce au Kratoscope.	127
Figure 54 : Immunohistochimie du bulbe olfactif antérieur après administration de NP-PLA-P188 ou de NP-PLA-P188-bBP, 1 h ou 3 h après administration intranasale.	128

<i>Figure 55 : Immunohistochimie du cerveau après administration de NP-PLA-P188-BP ou de NP-PLA-P188, 1 h ou 3 h après administration IN.</i>	129
<i>Figure 56 : Observation des NPs d'HfO₂ au microscope électronique à balayage (n=1)</i>	138
<i>Figure 57 : Caractérisation par la DLS et par la mobilité électrophorétique des NPs contenant des NPs d'HfO₂ seules ou avec la PH, la SERT ou la combinaison des deux.</i>	139
<i>Figure 58 : Évaluation de l'encapsulation de l'HfO₂ dans les NP-PLA avec la microscopie électronique à transmission (n=1).</i>	140
<i>Figure 59 : Viabilité des cellules RPMI 2650 après 24 h de contact avec les NPs contenant de l'HfO₂ ainsi que de la PH, de la SERT ou à la fois de la PH et de la SERT (n=1).</i>	141
<i>Figure 60 : Images au tomographe à rayons X d'une souris naïve sans traitement préalable</i>	142
<i>Figure 61 : Images au tomographe à rayons X d'une souris naïve non déminéralisée (A) ou déminéralisée pendant 14 jours (B).</i>	142
<i>Figure 62 : Images au tomographe à rayons X d'une souris naïve sans traitement préalable (la tête a été récupérée et imagée telle quelle, sans dissection), après un marquage des tissus mous à l'iode</i>	143
<i>Figure 63 : Images au tomographe à rayons X d'une souris ayant reçu des NP-HfO₂ par voie IN. Les images ont été prises 3 h après l'administration</i>	144
<i>Figure 64 : Images au tomographe à rayons X d'une souris ayant reçu des NP-HfO₂ par voie IN. Les images ont été prises 3 h après l'administration. Après déminéralisation, la tête a été marquée avec de l'iode pour faire ressortir les tissus mous</i>	144
<i>Figure 65 : (A) Images en bioluminescence pour le suivi de la taille des tumeurs. (B) Courbe de survie des souris à partir du jour de l'administration IN.</i>	146

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé de la composition, des caractéristiques et des méthodes d'évaluation des NPs polymériques utilisées pour l'ANC	64
Tableau 2 : Optimisation de la synthèse des NP-PLA par la méthode de nanopréciipitation.	76
Tableau 3 : Plan d'expérience pour l'adsorption du BP sur les NP-PLA (n=1)	116

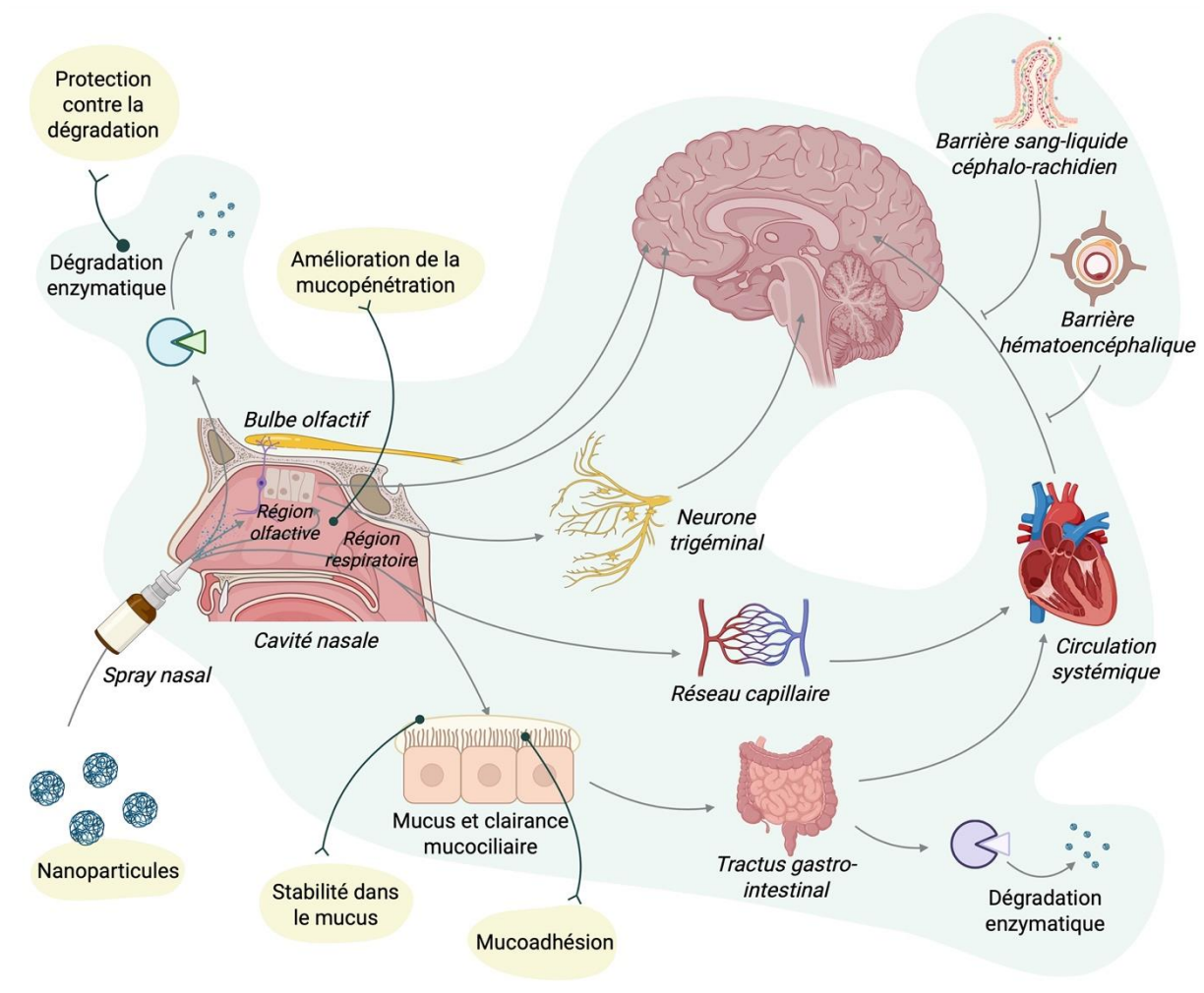
Liste des abréviations

ALI	Interface air-liquide
ANC	Administration du nez au cerveau
ARNsi	Petit acide ribonucléique interférent
A β	Bêta-amyloïde
BHE	Barrière hématoencéphalique
BP	Peptide bloquant
bBP	Peptide bloquant biotinylé
BSA	Albumine de sérum bovin
CBQCA	3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde
CPP	Peptide pénétrant dans les cellules
CRCL	Centre de recherche en cancérologie de Lyon
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DPD	Dynamique des particules dissipative
ECL	Chimiluminescence (enhanced chemiluminescence)
EDX	Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie
ENS	École Normale Supérieure
FDA	Agence américaine des denrées alimentaires et des médicaments
GFP	Protéine fluorescente verte (green fluorescent protein)
HfO ₂	Oxyde d'hafnium
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HRP	Peroxydase de raifort (Horseradish Peroxidase)
IN	Intranasal
INMG	Institut Neuromyogène
iPS	Souches pluripotentes induites
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IV	Intraveineux
JS	Jonctions serrées
LA	Acide lactique
LCR	Liquide céphalo-rachidien
MA	Maladie d'Alzheimer
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscope électronique à transmission
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium

NALT	Tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale
NGF	Facteur de croissance neuronale
NPs	Nanoparticules
NSO	Neurone sensitif olfactif
P188	Poloxamère 188
P407	Poloxamère 407
PBES	Plateau de biologie expérimentale de la souris
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PC	Pharmacocinétique
PCL	Poly ϵ -caprolactone
PD	Pharmacodynamique
PDI	Indice de polydispersité
PEG	Polyéthylène glycol
PFA	Paraformaldéhyde
PH	Perhexiline
PLA	Acide polylactique
PLGA	Acide polylactique co-glycolique
POE	Oxyde de polyéthylène
POP	Oxyde de polypropylène
P-Pac	Plateforme du petit animal du CRCL
PVA	Alcool polyvinylique
qPCR	PCR quantitative (polymerase chain reaction)
RVG	Glycoprotéine du virus de la rage
SERT	Sertraline
TAT	Transactivateur de la transcription
TDM	Tomodensitométrie
TEMP	Tomographe à émission de photons
TEP	Tomographe à émission de positons
TPGS	Succinate de D- α -tocophérol polyéthylène glycol 1000
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR2	Récepteur 2 du VEGF
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

CHAPITRE 1

Caractéristiques et évaluation des nanoparticules polymériques pour une administration efficace du nez au cerveau



Créée avec BioRender.com, inspirée de (1)

Les maladies du cerveau affectent plus d'un milliard de personnes dans le monde (2) avec un impact important sur le patient et les personnes aidantes. Malgré tout, beaucoup de ces maladies n'ont pas ou que très peu de traitements efficaces (3). Ce manque d'efficacité est en partie dû à la faible biodisponibilité dans le cerveau après une administration orale ou intraveineuse (IV), causée par la présence de multiples barrières physiologiques (4). Par exemple, dans le contexte du traitement de la maladie d'Alzheimer (MA), il existe seulement quatre médicaments disponibles qui réduisent uniquement les symptômes sans pour autant soigner complètement la maladie (5).

Parmi les différentes barrières qui protègent le cerveau, la barrière hématoencéphalique (BHE), qui entoure les vaisseaux sanguins cérébraux, est la plus difficile à traverser de par la présence de jonctions serrées extrêmement sélectives (6). En plus de cette BHE, d'autres barrières sont également présentes comme la barrière sang-liquide céphalo-rachidien (LCR) ainsi que la barrière arachnoïdienne. La superposition de ces barrières diminue la possibilité qu'une molécule thérapeutique passe de la circulation systémique au cerveau (7). Les stratégies non-invasives de contournement des différentes barrières se développent pour améliorer la biodisponibilité cérébrale des médicaments au cerveau et donc l'efficacité des traitements. Parmi ces moyens de contournement, une stratégie prometteuse est l'administration du médicament par la voie intranasale (IN). Grâce à l'anatomie particulière de la cavité nasale et la présence de cils neuronaux directement dans la cavité nasale, l'administration IN offre un passage direct jusqu'au cerveau. Cela permet d'éviter le passage à travers la BHE ainsi que les autres inconvénients des administrations orales comme l'effet de premier passage hépatique par exemple (8). Aujourd'hui, lorsque l'on recherche « brain » et « intranasal » dans les bases de santé publique comme EudraCT (bases de données des essais cliniques en Europe) et ClinicalTrials.gov (base de données des essais cliniques aux Etats-Unis, plus de 150 essais cliniques sont en cours pour tester l'administration IN de médicaments ciblant les maladies du cerveau (9–11). Ces essais cliniques sont de différentes phases : la phase I avec un petit groupe de volontaires sains ou malades pour étudier la toxicité (24 %), la phase II avec un groupe de volontaires malades pour étudier la tolérance et l'efficacité (33 %), la phase III avec un très grand nombre de patients pour évaluer l'intérêt thérapeutique du médicament (12 %) et enfin la phase IV pour suivre l'utilisation du médicament à long terme une fois mis sur le marché (8 %)

Malgré l'émergence de nouvelles voies d'administration comme la voie IN, l'amélioration de l'efficacité de l'administration reste un enjeu majeur. En effet, plusieurs facteurs doivent être pris en compte lors de la conception d'un médicament administré par voie IN : i) de nombreuses enzymes de la cavité nasale peuvent entraîner une dégradation du

principe actif ; ii) la clairance mucociliaire peut réduire le temps de contact avec la muqueuse nasale et iii) les caractéristiques du principe actif, telles que l'hydrophilie, le poids moléculaire et l'état d'ionisation peuvent influencer le passage à travers la muqueuse nasale (12).

Les vecteurs de médicaments, tels que les nanoparticules (NPs), ont été conçus pour protéger les médicaments et améliorer l'administration nez-cerveau (ANC) (12). Les NPs constituent une vaste catégorie de systèmes d'administration de médicaments facilitant le transport à travers les muqueuses (4). Les NPs présentent de nombreux avantages, notamment la protection du médicament, l'amélioration de la biodisponibilité grâce à l'augmentation du temps de résidence sur la muqueuse nasale et l'augmentation de la concentration de médicament délivrée au niveau du cerveau conduisant à l'amélioration de l'activité thérapeutique du médicament (13). Les NPs peuvent être de différents types : les NPs polymériques, les NPs à base de lipides, les NPs inorganiques, les nano-émulsions et les nanogels. Parmi ces NPs, les plus étudiées pour l'ANC sont les NPs inorganiques, les NPs à base de lipides et les NPs polymériques.

Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser sur les NPs polymériques spécialement conçues pour l'ANC. Nous discuterons de la composition et des caractéristiques physicochimiques des NPs utilisées, en particulier des polymères et des différentes molécules pouvant fonctionnaliser les NPs. Ensuite, l'évaluation *in vitro*, *ex vivo*, et *in vivo* de l'ANC sera présentée afin d'explorer les différentes manières de caractériser les NPs pour l'ANC. Enfin les différentes applications de ces NPs polymériques seront développées succinctement. L'ensemble des données de la littérature est résumé dans le Tableau 1.

I. Administration au cerveau par la voie nasale

A. Inconvénients des différentes voies d'administration

Les voies d'administration couramment utilisées par les patients présentent certains inconvénients lorsque le médicament doit atteindre le cerveau. En effet, une fois dans la circulation sanguine, le médicament préalablement administré par voie orale ou IV doit passer les différentes barrières qui protègent le cerveau. La BHE est une des barrières biologiques les plus difficiles à franchir. Elle est composée de cellules endothéliales, des péricytes et d'astrocytes, formant une barrière sélective entre le cerveau et le sang (Figure 1). Les cellules endothéliales entourent les vaisseaux sanguins et sont reliées entre elles par des jonctions serrées (JS) et des jonctions adhérentes, limitant le passage des molécules. Les péricytes sont localisés autour des cellules endothéliales et expriment à la fois des JS et des plaques d'adhésion. Enfin, les astrocytes sont des cellules gliales localisées autour des péricytes et

relient les cellules vasculaires et neuronales. Ils expriment également des JS. La superposition de ces trois types cellulaires qui expriment des jonctions fortes entre elles et les unes avec les autres, conduit à une barrière extrêmement efficace empêchant le passage des grosses molécules.

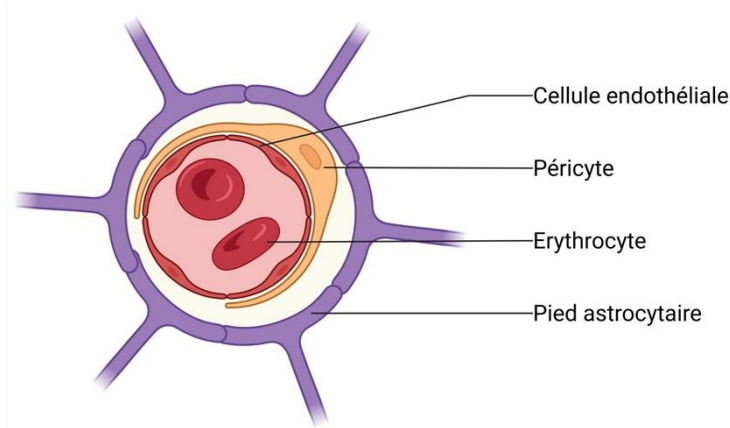


*Figure 1 : Représentation schématique de la BHE.
Créée avec BioRender.com*

Le transport de certaines molécules comme les ions, les neurotransmetteurs et les nutriments est possible ainsi que des molécules lipophiles de moins de 400 Da ou susceptibles d'établir moins de huit liaisons hydrogènes (6,14). Les JS exprimées par les cellules endothéliales sont spécifiques et sélectives, un transport actif est donc nécessaire pour que les molécules traversent la BHE (15,16). Cette sélectivité a un impact sur la biodisponibilité cérébrale du médicament administré par une voie d'administration systémique, comme la voie orale ou IV. De plus, la présence de transporteurs actifs d'efflux comme la glycoprotéine-P permettent d'éviter l'accumulation de molécules toxiques dans le cerveau mais celle des médicaments visant le système nerveux central (14).

D'autres barrières existent au niveau du cerveau. La barrière sang-LCR est retrouvée dans les plexus choroïdes, qui sécrètent le LCR, au niveau des ventricules cérébraux. Ces plexus contiennent de nombreux capillaires entourés d'une couche unique de cellules épithéliales avec de nombreuses JS. La barrière arachnoïdienne, quant à elle, se situe entre le LCR dans l'espace sous-arachnoïdien et la dure-mère. De la même manière, elle est composée d'une couche de cellules épithéliales reliées entre elles par des JS (7). La superposition de ces trois barrières permet notamment de protéger le cerveau des agressions extérieures mais empêchent aussi le passage des médicaments.

Différentes stratégies de contournement de la BHE et des autres barrières du cerveau ont été étudiées mais sans succès franc et avec des risques non négligeables (17). De plus, cela

ne contourne pas les différents métabolismes, notamment de l'intestin et du foie, qui sont caractéristiques des administrations orales et IV.

D'autres voies d'administration peuvent être utilisées pour arriver directement au niveau du cerveau notamment l'injection cérébrale (directement dans le parenchyme, dans la moelle épinière ou bien dans les ventricules cérébraux) par stéréotaxie mais encore l'injection intrarachidienne ou intrathécale, directement dans la moelle épinière, entre l'arachnoïde et la pie mère. Cependant, ces méthodes sont extrêmement invasives et difficiles à réaliser, elles sont donc utilisées dans des cas extrêmement rares ou graves (8). Ainsi la voie IN semble être la solution idéale pour l'administration de médicaments pour atteindre le cerveau.

B. Anatomie de la cavité nasale

La cavité nasale humaine est le premier élément du système respiratoire. Ses principaux rôles sont la respiration et l'olfaction. La cavité nasale est tapissée d'une muqueuse riche en vaisseaux sanguins, ce qui facilite le réchauffement rapide et l'humidification de l'air inhalé. La cavité nasale est composée de trois zones principales : la zone vestibulaire, la zone olfactive et la zone respiratoire (Figure 2) (18).

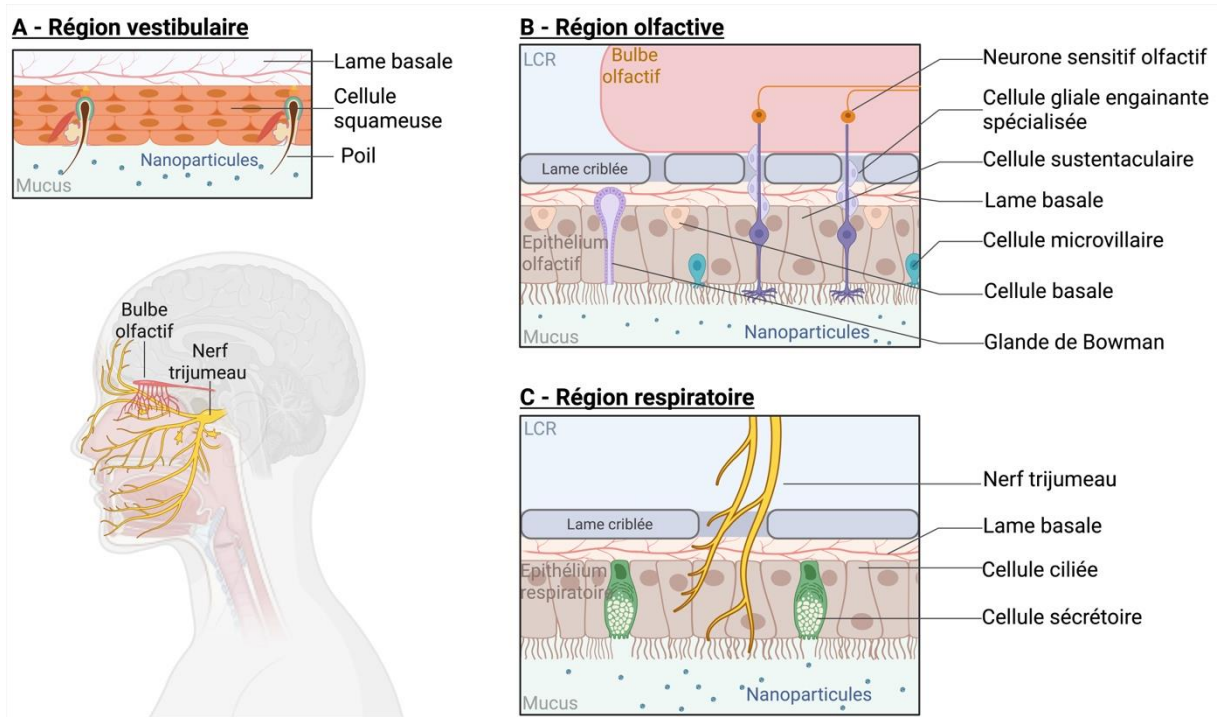


Figure 2 : Les différents épithéliums de la cavité nasale et les voies d'accès au cerveau.

La région la plus antérieure est la région vestibulaire (A). La région olfactive (B) est la région principale où a lieu l'ANC. La majeure partie de la cavité nasale est la région respiratoire (C) où l'ANC peut passer par le nerf trijumeau (LCR : liquide céphalo-rachidien). Créée avec BioRender.com.

Tout d'abord, la **région vestibulaire** est la plus proche de l'extérieur. Elle est composée d'un épithélium pavimenteux qui protège des irritations grâce à une production importante de mucus et la présence de poils (Figure 2A) (18).

La **région olfactive** représente environ 3 % de la surface de la cavité nasale humaine (Figure 2B). La muqueuse olfactive est un épithélium cylindrique pseudostratifié composé de neurones sensitifs olfactifs (NSO), de cellules sustentaculaires, de cellules microvillaires et de cellules basales (19). Les NSO sont des neurones bipolaires non myélinisés dont les corps cellulaires sont situés dans l'épithélium de la muqueuse olfactive. Ils projettent dans la cavité nasale, protégée par la couche de mucus, des cils exprimant des récepteurs olfactifs sensibles aux molécules odorantes. Les axones des NSO traversent la lame criblée de l'ethmoïde pour atteindre le bulbe olfactif où ils font des synapses avec d'autres neurones du cerveau (20). Les cellules sustentaculaires sont situées à côté des NSO et elles régulent et maintiennent l'homéostasie autour des neurones (19). Les cellules microvillaires sont supposées être des chimiorécepteurs, mais leur rôle précis n'a pas encore été entièrement décrit. Les cellules basales sont des cellules souches situées près de la lame basale qui peuvent régénérer les NSO (19). Les glandes de Bowman se trouvent, quant à elle, dans l'épithélium olfactif et sont responsables de la sécrétion de mucus (19). La région olfactive est également composée de cellules gliales engainantes spécialisées qui contribuent au maintien de l'électrophysiologie des NSO matures et qui participent également à leur régénération (19).

Enfin, la **région respiratoire** couvre environ 85 % de la cavité nasale (Figure 2C). Il s'agit d'un épithélium cylindrique pseudostratifié composé d'une grande variété de cellules, dont des cellules ciliées et des cellules sécrétoires telles que les cellules caliciformes ou les cellules séro-muqueuses. Les cellules ciliées possèdent des cils mobiles qui déplacent le mucus sur toute la muqueuse. Les cellules sécrétoires produisent une grande partie des sécrétions nasales, à la fois du mucus et des enzymes, qui agissent comme un filtre contre les agents pathogènes et les allergènes présents dans l'air inhalé. La muqueuse respiratoire est innervée par le nerf trijumeau qui se termine également dans l'épithélium vestibulaire et olfactif (20,21).

Ces différentes régions, par la diversité de leur composition cellulaire, possèdent des caractéristiques spécifiques contribuant à des fonctions physiologiques particulières. Leur proximité avec les cellules neuronales fait de la cavité nasale un point d'entrée intéressant pour atteindre le cerveau.

C. Différentes voies d'accès du nez au cerveau

Il existe différentes connexions entre la cavité nasale et le cerveau, ces voies peuvent être soit directes, via les NSO ou le nerf trijumeau, soit indirectes (Figure 2).

La **voie olfactive** est basée sur la présence de six millions de NSO dans la muqueuse olfactive humaine (22). Les molécules qui atteignent l'épithélium olfactif peuvent soit être internalisées par endocytose ou diffusion passive par les cellules sustentaculaires (voie transcellulaire), soit traverser les jonctions serrées entre les cellules (voie paracellulaire), soit être absorbées par les cellules neuronales par endocytose ou pinocytose et transportées le long de l'axone jusqu'à la synapse dans le bulbe olfactif (voie intracellulaire) (Figure 2B) (23). Dans tous les cas, les médicaments ou les NPs peuvent pénétrer dans le bulbe olfactif et le LCR pour être distribués par la suite dans le cerveau (24).

Les molécules thérapeutiques peuvent également emprunter la **voie du nerf trijumeau** aussi bien dans l'épithélium olfactif que dans l'épithélium respiratoire. Les molécules doivent d'abord diffuser à travers la muqueuse nasale pour ensuite atteindre le tronc cérébral via le nerf trijumeau, soit par voie intracellulaire, soit par voie extracellulaire (25). Par exemple, il a été prouvé que la fluorescence était visible dans le nerf trijumeau une heure après l'administration de microsphères fluorescentes et jusqu'à 7 jours après administration dans le ganglion trigéminal (Gasser) (21).

Une fois que les NPs atteignent le bulbe olfactif par la voie olfactive ou le tronc cérébral par la voie trigéminal, il reste une étape de diffusion au reste du cerveau. Cela peut se produire par la voie intracellulaire, grâce aux synapses entre les neurones sensitifs olfactifs périphériques pour la voie olfactive ou bien dans le ganglion trijumeau. Un transport dans les espaces intercellulaires du cerveau est également possible. Le mécanisme complet de cette diffusion n'est pas entièrement compris à l'heure actuelle (8).

Si les NPs ne sont pas capables d'entrer dans les cellules et restent dans l'environnement extracellulaire, elles empruntent la **voie indirecte** et peuvent être absorbées par les vaisseaux lymphatiques ou sanguins (8). En effet, la muqueuse nasale étant très vascularisée, les NPs administrées par voie IN peuvent diffuser à travers la muqueuse olfactive ou respiratoire et atteindre le sang en traversant l'endothélium. Ce mécanisme d'adsorption indirecte permet aux NPs d'atteindre la circulation systémique. Les NPs doivent ensuite traverser la BHE pour atteindre le cerveau (26).

D. Avantages de la voie nasale

L'ANC présente de nombreux avantages, la principale étant le contournement de la BHE, comme mentionné précédemment.

En empêchant également sa dégradation par les enzymes digestives ou en évitant l'effet de premier passage hépatique, l'ANC permet d'améliorer la biodisponibilité et la concentration du médicament au niveau du cerveau. Cela implique une plus grande quantité de médicament délivrée au cerveau par rapport à d'autres modes d'administration (27).

L'ANC permet une absorption rapide du médicament, principalement en raison d'une grande surface d'échanges, grâce à la présence de cils et à la finesse de l'épithélium (28). Elle permet également de réduire la quantité de médicament qui atteint la circulation sanguine, minimisant ainsi le risque d'effets secondaires systémiques (29). Par exemple, lorsque Nigam *et al.* ont conçu des NPs pour l'ANC, ils ont découvert que le médicament était plus abondant dans le cerveau après une administration IN plutôt qu'après une administration IV, avec une dose administrée identique (30).

De plus, l'administration IN est une technique d'administration non invasive, indolore, sûre et facile à réaliser, ce qui permet d'augmenter considérablement l'adhésion thérapeutique et l'observance du traitement par le patient et qui facilite les administrations répétées (31). En cas d'urgence, cette voie peut également être utilisée sur des patients inconscients. Il a également été rapporté que la voie IN est préférée aux autres voies d'administration à la fois par les patients et par les soignants (32).

L'ANC, via les différents chemins d'accès du nez au cerveau, offre ainsi de nombreux avantages pour le traitement des maladies du cerveau, en utilisant l'épithélium unique qu'est l'épithélium nasal, permettant une absorption rapide et un accès direct au système nerveux central, en contournant la BHE et en réduisant les effets secondaires systémiques.

E. Verrous scientifiques liés à l'administration intranasale

Malgré les nombreux avantages, certains inconvénients doivent être pris en compte lors de la mise au point de traitements pour l'ANC comme mentionné précédemment. L'une des principales barrières entre la cavité nasale et la muqueuse est le mucus.

1. Mucus

Le mucus est essentiel à la santé et à la fonctionnalité des voies respiratoires. Il est principalement composé de glycoprotéines appelées mucines, mais aussi de sels, de lipides, d'ADN, de cellules et de débris cellulaires (33). Il existe 13 mucines différentes, sécrétées

principalement par les cellules caliciformes et les cellules séro-muqueuses, mais seules sept sont prédominantes : quatre associées à la membrane (Muc1, Muc4, Muc16 et Muc20), une sécrétée (Muc7) et deux gélifiantes (Muc5AC et Muc5B) (34). Les mucines associées à la surface cellulaire sont directement liées à l'épithélium, créant une barrière et coordonnant les mouvements des cils. Le rôle de la mucine sécrétée est de retenir l'eau. Les mucines gélifiantes piègent les NPs qui doivent être évacuées (35). Ce réseau gélifié présente des pores de 150 ± 50 nm de diamètre qui influencent la perméabilité du mucus. En effet, le mucus est une barrière semi-perméable capable de filtrer les molécules en fonction de leur taille ou en interagissant avec elles (33). Le mucus et les mucines ont donc un rôle important dans l'immunité en étant une barrière mais aussi en interagissant avec les cellules dendritiques et en médiant les voies de la cascade inflammatoire (35). L'épithélium olfactif est différent de l'épithélium respiratoire en partie en raison de l'expression différentielle des mucines, car l'épithélium olfactif exprime Muc1, Muc5AC et Muc5B différemment de l'épithélium respiratoire. Par exemple, Muc1 est exprimée de façon homogène à la surface de l'épithélium olfactif alors qu'elle l'est de manière plus hétérogène dans la muqueuse respiratoire (34).

Le mucus de la cavité nasale a une épaisseur de 10 à 15 μ m et est composé de deux couches, l'une plus liquide près de l'épithélium et l'autre plus épaisse au contact de la lumière (36). La force ionique et le pH autour de 6 ont également un impact sur la filtration en modifiant la perméabilité et la viscoélasticité du mucus. Les changements de pH peuvent modifier les interactions entre les mucines et modifier la viscoélasticité. Par exemple, un pH plus basique tend à réduire la viscosité et à augmenter la perméabilité de la muqueuse nasale (33). Le mucus est réparti à la surface de la cavité nasale grâce à la présence de cils mobiles.

2. Clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire est également un facteur qui influence l'absorption nasale. Ce mécanisme est crucial pour la défense contre les corps étrangers. Les principaux acteurs de la clairance mucociliaire sont les cils à la surface des cellules épithéliales et le mucus. Ces cils battent de manière coordonnée et unidirectionnelle et peuvent éliminer de manière non spécifique toute molécule capturée par le mucus (37). La clairance mucociliaire est de 12 à 15 min (38). En effet, certaines molécules adhérant fortement au mucus chargé négativement peuvent être transportées vers le nasopharynx et éliminées par déglutition, ce qui peut constituer un défi pour l'adsorption nasale de médicaments (39).

3. Enzymes

Dans la région respiratoire de la cavité nasale, les cellules caliciformes et séro-muqueuses sécrètent des enzymes qui protègent les voies respiratoires de la contamination par des agents pathogènes volatils. La plupart des enzymes de la cavité nasale, telles que les protéases et les peptidases, sont présentes en plus fortes concentrations au niveau de l'épithélium olfactif (40). En plus de métaboliser les médicaments, les enzymes peuvent modifier leur profil de solubilité, altérer leur activité ou réduire leurs propriétés de perméation, ce qui peut influencer leur passage de la cavité nasale au cerveau (38). Parmi ces enzymes, la P-glycoprotéine, une pompe d'efflux, le cytochrome P450 et d'autres enzymes protéolytiques peuvent former un « pseudo-effet de premier passage » et réduire la quantité de médicament délivrée au cerveau (40).

4. Dispositif d'administration

Même si l'administration IN semble très prometteuse pour l'ANC, des dispositifs doivent être conçus pour délivrer le médicament dans la région nasale d'intérêt. La conception d'un tel spray nasal reste un défi car la taille des gouttelettes, le mode de pulvérisation et le contenu d'une dose unique peuvent avoir un impact sur le lieu de dépôt (41). Par exemple, il a été prouvé que les gouttelettes d'une taille d'environ 20 μm seront plus concentrées dans la région antérieure de la cavité nasale. Au contraire, lorsque la taille des gouttelettes est d'environ 10 μm , elles ont tendance à pénétrer plus profondément dans les voies respiratoires, atteignant les voies respiratoires inférieures (12). Mais même si ces dispositifs de pulvérisation nasale peuvent délivrer des médicaments dans différentes parties de la cavité nasale, une administration plus ciblée sur la muqueuse olfactive est nécessaire pour assurer une forte biodisponibilité du médicament dans le cerveau (42).

En conclusion, malgré de nombreux avantages, l'ANC présente certaines barrières et l'un des moyens de surmonter ces défis est l'utilisation de NPs, plus particulièrement les NPs polymériques, qui peuvent s'adapter à la présence de mucus et à la clairance mucociliaire, protéger le médicament de la dégradation enzymatique et améliorer la rétention dans la cavité nasale, améliorant ainsi l'efficacité de l'administration du médicament.

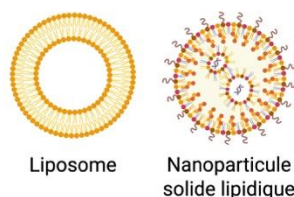
II. Utilisation des nanoparticules

Les NPs ont été largement utilisées pour le ciblage des médicaments vers le cerveau, principalement en utilisant la voie IV. Cependant, malgré une légère amélioration de la biodisponibilité cérébrale, ces NPs se retrouvent majoritairement dans le foie, la rate ou bien les urines. Dans le cas de l'ANC, il a été fréquemment prouvé que l'utilisation des NPs permettant une bien meilleure biodisponibilité cérébrale du principe actif, en comparant avec ce médicament en solution. Différents types de NPs ont été étudiés (Figure 3) : les NPs polymériques, les NPs à base de lipides ou les NPs inorganiques (43).

Nanoparticules à base de polymères



Nanoparticules à base de lipides



Nanoparticules inorganiques

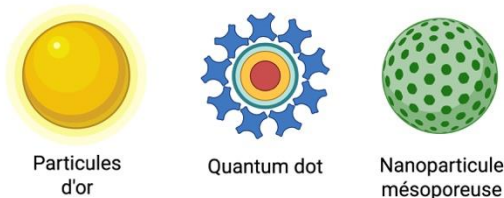


Figure 3 : Exemples de types de NPs utilisées pour l'ANC.
Créée avec BioRender.com

A. Différents types de nanoparticules

1. Liposomes et nanoparticules lipidiques

Les NPs lipidiques, de la même manière que d'autres types de NPs, sont reconnues pour leur capacité de protection du principe actif. Elles sont capables de véhiculer à la fois des molécules hydrophiles et des molécules hydrophobes. Leur toxicité est faible, elles présentent une bonne perméabilité et elles sont facilement modifiables pour s'adapter à chaque application (44). La composition en lipides est modulable, ce qui peut être très intéressant dans le contexte de l'administration IN pour notamment éviter les effets indésirables locaux

comme l'irritation ou des dommages tissulaires. De plus, les NPs lipidiques peuvent être facilement synthétisées à grande échelle et stérilisées. Le principal inconvénient de ce type de NPs est l'encapsulation limitée en quantité de médicament dans la NP, ce qui sous-entend d'utiliser des médicaments suffisamment efficaces pour être administrés à petite dose (45). Parmi ces NPs lipidiques, nous retrouvons notamment les liposomes et les NPs lipidiques solides (44).

Les **liposomes** sont composés principalement de lipides formant une ou plusieurs bicouches qui résultent en une NP dont la taille peut varier entre 20 nm et plus de 1000 nm. La modification de la composition en lipides permet de faire varier différents paramètres dont la charge de surface et la taille (46). Les liposomes sont aussi utilisés pour l'ANC, notamment pour améliorer l'efficacité de la rivastigmine, un médicament déjà commercialisé pour cibler la MA. Les chercheurs ont pu démontrer que l'utilisation des liposomes permettait une amélioration de la biodisponibilité de la rivastigmine dans le cerveau et de son efficacité, sans pour autant causer de toxicité au niveau de la cavité nasale.

Les **NPs lipidiques solides** sont composées d'un cœur lipidique agencé de manière compacte grâce à des lipides dont la température de transition est supérieure à celle du corps humain. Le principe actif est dissous ou dispersé dans ce cœur solide et le tout est recouvert d'une couche de surfactant qui permet la dispersion dans un milieu aqueux et qui améliore la stabilité de la NP (47). Des chercheurs ont, par exemple, encapsulé un antidépresseur, l'agomélatine, dans des NPs lipidiques solides, ce qui a permis d'améliorer la biodisponibilité cérébrale du médicament (48).

Malgré leur fort potentiel pour l'ANC (49,50), des challenges concernant leur capacité limitée à encapsuler de grandes quantités de médicaments ainsi que leur localisation spatiale dans le cerveau restent à élucider avant de les tester chez l'humain (51).

2. Nanoparticules inorganiques

Les NPs inorganiques sont considérées comme hydrophiles et extrêmement stables par comparaison avec les autres types de NPs organiques. De plus, elles ont des propriétés intrinsèques particulières notamment en termes de propriétés magnétiques ou optiques. Elles ont également une meilleure capacité de chargement du médicament. Les NPs inorganiques sont principalement les NPs à base d'or, d'argent, de carbone, d'oxyde de fer, de zinc ou de silice (52).

Le principal avantage des NPs inorganiques est la possibilité de les suivre par imagerie avec les rayons X ou par imagerie par résonance magnétique (IRM) (53). De plus, l'utilisation

de NPs magnétiques peut permettre de guider ces NPs, à l'aide d'un champ magnétique, jusqu'à leur site d'action (54). Différentes équipes de recherche ont pu démontrer l'intérêt des NPs inorganiques pour l'ANC (55,56). Cependant, de nombreux questionnements subsistent quant à leur utilisation, notamment au niveau de leur compatibilité *in vivo* et leur potentielle toxicité (51).

3. Nanoparticules à base de polymères

Les NPs à base de polymères peuvent être réparties, selon leur morphologie, en différentes catégories : les dendrimères, les micelles, les nanogels, les nanocapsules et les NPs polymériques (57).

Les **dendrimères** sont des structures ramifiées avec un noyau interne. Leur taille varie entre 1 et 100 nm, et est généralement inférieure à 10 nm. Les dendrimères sont des structures uniques et très versatiles, permettant de véhiculer des molécules hydrophiles ou hydrophobes. Le médicament est lié à la structure par liaison covalente ou électrostatique. Leur principal avantage est leur forte solubilité et leur grande stabilité, leur capacité à éviter les macrophages et leur facilité à passer les différentes barrières biologiques. Cependant, les dendrimères peuvent présenter une certaine instabilité dans le chargement du médicament et une libération inefficace du médicament au niveau du site d'action (57). Les dendrimères ont pu être utilisés dans le contexte de l'ANC, notamment pour l'administration d'un médicament antipsychotique, l'halopéridol. Les chercheurs ont pu montrer que la combinaison dendrimères et administration IN a pu donner le même effet que le médicament seul administré par injection intrapéritonéale mais en utilisant sept fois moins de médicament (58).

Les **micelles polymériques** sont constituées d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile, formée par l'agrégation spontanée de polymères amphiphiles, dans un milieu aqueux. La concentration de ces polymères est supérieure à la concentration micellaire critique, ce qui engendre la formation des micelles. Elles peuvent encapsuler des médicaments hydrophobes (43). Ces micelles ont déjà été évaluées pour l'ANC et il a été montré qu'elles permettaient une meilleure biodisponibilité dans le cerveau (59).

Les **nanogels** sont des structures tridimensionnelles avec des paramètres de porosité et de taille des pores variables. Ils sont sphériques et leur taille varie entre 20 et 250 nm. Ils présentent une très bonne biocompatibilité, une teneur élevée en eau et un potentiel de chargement de médicament important (60). Pour cela, ils ont été également évalués pour l'ANC. Les chercheurs ont ainsi développé un nanogel pour administrer de l'insuline du nez au cerveau. Ils ont réussi à montrer *in vivo* que leur formulation était biocompatible et non-

immunogène, et qu'elle permettait d'obtenir une plus grande quantité d'insuline dans toutes les parties du cerveau, que lorsque cette dernière est administrée seule par voie IN (61).

Les **nanocapsules** sont composées d'un cœur qui constitue un réservoir dans lequel nous retrouvons le principe actif. Ce cœur lipophile est entouré d'une couche de polymère (47). Leur taille peut varier entre 50 et 400 nm. Elles peuvent également être utilisées pour former une couche protectrice autour d'une cellule ou d'un enzyme (57). L'équipe de Bruinsmann *et al.* a développé des nanocapsules avec un cœur lipidique entouré d'une couronne de chitosane, encapsulant la simvastatine pour ses propriétés anticancéreuses. Leur administration par voie IN a permis de montrer l'efficacité supérieure des nanocapsules de simvastatine par rapport à la simvastatine seule notamment sur la taille des tumeurs cérébrales (62).

Les **NPs polymériques** sont des NPs colloïdales, c'est-à-dire suspendues dans un fluide, dont la taille peut varier entre 10 et 1000 nm. Elles peuvent être constituées de polymères biodégradables ou non. Elles peuvent être facilement prises en charge par les cellules, et peuvent libérer le principe actif de manière prolongée. Ces NPs sont souvent sensibles à leur environnement (pH, force ionique, pression) (57). Les NPs polymériques sont très largement utilisées, pour l'ANC mais également pour d'autres applications, en raison de leurs avantages uniques. Composées d'un ou de plusieurs polymères, ces NPs se distinguent par leur conception simple et leur excellente biocompatibilité. La grande variété de polymères disponibles permet de créer différentes NPs avec des fonctionnalités chimiques et biologiques adaptées (18). De plus, les NPs polymériques permettent un contrôle précis de la charge de surface et de la taille des NPs, des paramètres critiques pour une ANC efficace. Leur surface peut être fonctionnalisée pour améliorer les caractéristiques souhaitées, telles que la mucoadhésivité ou les capacités de pénétration cellulaire, améliorant ainsi leur interaction avec l'environnement nasal. En outre, les NPs polymériques constituent une plateforme polyvalente pour répondre aux limites de la cavité nasale, offrant des solutions potentielles à des problèmes tels que la dégradation enzymatique et la clairance mucociliaire (63).

B. Polymères comme brique centrale de la nanoparticule

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés aux NPs polymériques pour les nombreux avantages qu'elles présentent et leurs inconvénients limités que nous avons développés ci-dessus.

Différents polymères peuvent être utilisés comme brique centrale des NPs comme mentionné dans le Tableau 1 (Figure 4 et Figure 5).

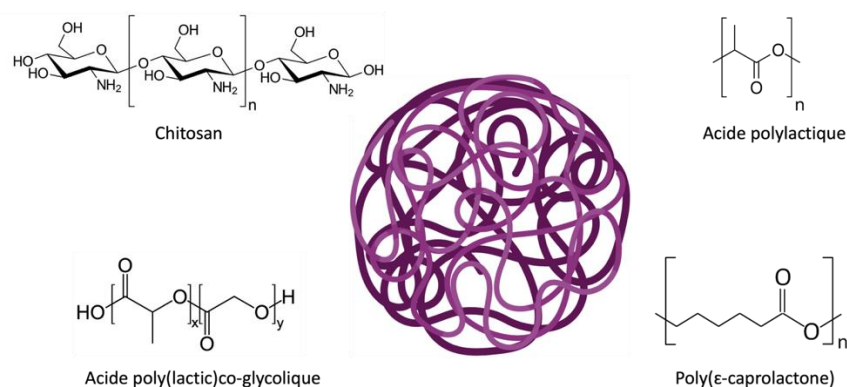


Figure 4 : Différents polymères peuvent être utilisés pour constituer le cœur de la NP pour l'ANC.
Créée partiellement avec BioRender.com

1. Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire dérivé naturellement de la désacétylation de la chitine. Il est obtenu à partir de carapaces de crustacés ou d'insectes, de champignons, de levures ou d'algues (64). Le chitosane est de plus en plus utilisé pour des applications médicales et pharmaceutiques ; il est retrouvé parmi les produits approuvés pour leur effet antibactérien ou la cicatrisation des plaies par exemple (63).

Le chitosane est l'un des polymères cationiques les plus utilisés pour l'ANC. Le chitosane le plus couramment utilisé a un faible poids moléculaire, ce qui permet de concevoir des NPs plus petites qu'avec le chitosane de poids moléculaire plus élevé (65). L'utilisation du chitosane pour les NPs utilisées pour l'ANC est principalement due à ses propriétés avantageuses. Il est considéré comme non toxique, biocompatible et biodégradable (66). Le chitosane est également très intéressant pour l'ANC en raison de ses propriétés mucoadhésives. À un pH acide, ses charges positives interagissent avec les charges négatives des mucines et avec les jonctions cellulaires, ce qui permet sa rétention dans la cavité nasale (67). Lorsque l'épithélium est en contact avec le chitosane, les protéines des JS sont redistribuées, permettant leur ouverture et le passage de molécules. Cette redistribution des protéines est réversible, ainsi le chitosane n'a pas d'impact à long terme sur l'épithélium (66). Le chitosane peut être modifié par l'ajout de différentes molécules grâce aux fonctions N-acétylées et désacétylées de la glucosamine. Par exemple, le chitosane peut être transformé en chitosane thiolé pour améliorer à la fois sa mucoadhésivité et sa perméabilité. Cette dernière s'explique par la liaison covalente entre le chitosane thiolé et la couche de mucus (68). Inversement, l'un des principaux inconvénients de l'utilisation du chitosane est sa faible solubilité dans l'eau à un pH neutre ou basique. Dans le contexte de l'ANC, la solubilité du chitosane peut être améliorée dans le mucus nasal acide par des modifications chimiques (69).

Bhattamisra *et al.* ont conçu des NPs de chitosane de 75 nm encapsulant la rotigotine pour le traitement de la maladie de Parkinson. En comparant l'administration IN du médicament libre et du médicament encapsulé dans ces NPs de chitosane chargées positivement, ce dernier a eu un effet pharmacologique plus important que le médicament seul sur le modèle animal (70). De même, Shukr *et al.* ont encapsulé de l'agomélatine dans des NPs de chitosane positives de 190 nm pour son activité antidépressive et ont découvert que la concentration du médicament augmentait dans le cerveau après l'administration IN des NPs (71). Uppuluri *et al.* ont conçu des NPs de chitosane positives de 148 nm véhiculant du piribédil dans un gel de méthylcellulose et, après administration IN *in vivo*, les NPs et les NPs dans le gel ont montré une plus grande disponibilité dans le cerveau que le médicament seul (72). Ces trois études ont montré que les NPs de chitosane étaient une alternative efficace à l'utilisation du médicament libre pour l'ANC. En outre, le chitosane peut également être utilisé comme couronne sur des NPs préformées (73).

2. Acide polylactique co-glycolique (PLGA)

Les polymères synthétiques tels que l'acide poly(lactique)co-glycolique (PLGA) ont été largement étudiés car ils présentent une reproductibilité et une pureté supérieures à celles des polymères naturels. Le PLGA est disponible dans le commerce et est approuvé par l'Agence américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA) et l'Agence européenne des médicaments (74). Le PLGA est un polymère biocompatible et biodégradable car ses monomères sont endogènes et font partie du cycle de l'acide citrique. En raison de sa structure, le poids moléculaire et le ratio de copolymères peuvent varier pour ajuster la taille, la capacité d'encapsulation, la capacité de libération et la biocompatibilité des NPs (75).

En effet, les NPs de PLGA sont développées pour l'ANC de traitements pour plusieurs pathologies. Chu *et al.* ont utilisé des NPs de PLGA de 146 nm pour montrer l'efficacité de leur traitement sur la survie de rats atteints de gliomes. Ils ont démontré que leur formulation chargée positivement était localisée dans le cerveau après l'administration IN et qu'elle améliorait la survie des rats (76). Les NPs de PLGA peuvent avoir une capacité d'encapsulation élevée. Nigam *et al.* ont conçu des NPs de PLGA de 178 nm chargées positivement, encapsulant deux médicaments, le baclofène et la lamotrigine, pour cibler les douleurs neuropathiques. Ils ont montré que, non seulement une concentration élevée de médicament dans le cerveau était atteinte, mais aussi que ces NPs de PLGA avaient un effet pharmacologique *in vivo* après l'administration IN (30). Enfin, ces NPs peuvent être utilisées pour adsorber des molécules plus grosses telles que des anticorps. Musumeci *et al.* ont décrit l'adsorption d'un anticorps à la surface de NPs de PLGA ciblant la protéine bêta-amyloïde physiopathologique dans la MA. Après l'administration IN de NPs fonctionnalisées de 543 nm, des anticorps ont été trouvés

dans le cerveau des souris (77). Les NPs de PLGA sont donc très prometteuses pour l'ANC car elles sont très polyvalentes en termes de médicaments absorbés ou encapsulés.

3. Acide polylactique

L'acide polylactique (PLA) est un polymère intéressant dans le domaine médical car il est à la fois biocompatible et biodégradable. En raison de ses propriétés adaptées, le PLA a été approuvé aux États-Unis par la FDA pour plusieurs applications telles que les implants et les prothèses. Le PLA est également non toxique et a été utilisé pour la préparation de systèmes d'administration de médicaments. Le PLA est hydrophobe et constitue donc un bon candidat pour l'encapsulation de médicaments hydrophobes, les protégeant ainsi de la dégradation (78). Les propriétés physicochimiques peuvent être contrôlées pour obtenir les caractéristiques désirées pour la synthèse de NPs. De plus, dans les NPs de PLA, l'agent actif est souvent dispersé de manière homogène, ce qui entraîne une libération continue du médicament (79). Musumeci *et al.* ont préparé des NPs de PLA, des NPs de PLGA et des NPs de chitosane de respectivement 152 nm, 133 nm et 181 nm de diamètre. Les NPs de PLA et de PLGA étaient chargées négativement et les NPs de chitosane étaient chargées positivement. Ils ont comparé l'internalisation dans les cellules gliales engainantes spécialisées et ont conclu que les NPs de PLA et de chitosane étaient plus appropriées pour l'ANC que les NPs de PLGA, mais que les NPs de chitosane étaient plus grosses et moins homogènes que les NPs de PLA (80).

Les NPs de PLA peuvent également être utilisées pour délivrer différents types de molécules. Veronesi *et al.* ont utilisé des NPs de PLA de 108 nm pour administrer l'hormone de libération de la thyrotropine en tant qu'antiépileptique. Après l'administration IN, ils ont démontré l'impact positif des NPs de PLA contenant le médicament sur l'apparition des crises d'épilepsie (81). De plus, Jain *et al.* ont conçu des NPs de PLA contenant du méthotrexate dans un hydrogel thermosensible pour traiter le glioblastome. Ils ont mesuré un diamètre à 351 nm et une charge à -25 mV. Ils ont montré que le médicament libre et le médicament véhiculé par les NPs de PLA pouvaient atteindre le cerveau de manière similaire 2 heures après l'administration IN, et que seul le médicament véhiculé dans les NPs était encore présent 24 heures après l'administration. Par conséquent, ils ont montré la capacité de cibler le cerveau avec des NPs de PLA, mais aussi un petit effet de rétention lorsque des NPs sont utilisées (82). Ces études démontrent le potentiel et la flexibilité de l'utilisation du PLA comme noyau polymérique des NPs dans le contexte de l'ANC.

4. Autres types de polymères

Le poly(ϵ -caprolactone) (PCL) est un polymère formé d'une chaîne de polyester aliphatique, biodégradable et pouvant s'agréger en NPs (83). Par exemple, Sawant *et al.* ont utilisé des NPs de PCL encapsulant de l'aripiprazole pour traiter la schizophrénie et, après l'administration IN, elles ont montré une meilleure efficacité de ciblage du cerveau permettant de réduire à la fois la dose et la toxicité (84).

D'autres types de polymères peuvent être utilisés pour synthétiser des NPs pour l'ANC. C'est le cas, par exemple, de l'alginate qui a permis d'augmenter le temps de rétention dans la cavité nasale par ses propriétés mucoadhésives et de diminuer l'adsorption pulmonaire grâce à l'augmentation de la taille des NPs (85). Une autre équipe de recherche a synthétisé des NPs de polystyrène qui ont pu être retrouvées dans l'épithélium après une administration intranasale (86).

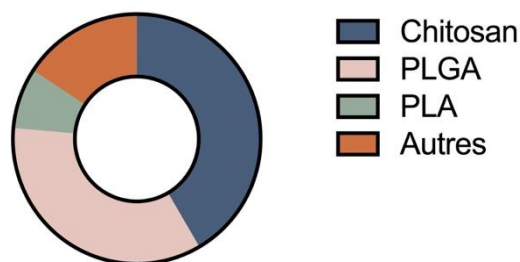


Figure 5 : Polymères comme structure de base des NPs utilisées pour l'ANC

Tous ces polymères ont été largement étudiés pour l'ANC en raison de leur biocompatibilité et de leur biodégradabilité (87). Selon le polymère choisi pour composer leur cœur, les NPs peuvent être chargées positivement ou négativement et leur taille peut être modulée. Mais même si elles sont pertinentes pour l'ANC en elles-mêmes, elles sont souvent fonctionnalisées soit par modification du polymère (greffage chimique d'une fraction fonctionnelle), soit par l'ajout d'une autre molécule dans la synthèse pour modifier ou renforcer leurs propriétés afin d'améliorer encore l'ANC.

C. Fonctionnalisation des nanoparticules polymériques

Le cœur polymérique des NPs peut être modifié et greffé avec d'autres molécules pour améliorer la formulation en augmentant à la fois la furtivité et la stabilité, en équilibrant à la fois la mucoadhésion et la mucopénétration et en améliorant la pénétration de la muqueuse nasale pour améliorer la biodisponibilité cérébrale. Un résumé des molécules utilisées est présenté dans le Tableau 1.

1. Amélioration de la stabilité et de la furtivité

Différentes molécules peuvent être ajoutées pour faciliter la formulation des NPs et leur stabilité. *In vivo*, l'hydrophobie de surface de certaines NPs polymériques peut activer une réaction immunitaire de l'hôte déclenchant la dégradation des NPs. L'un des principaux phénomènes est l'opsonisation, où les protéines sanguines se lient aux NPs conduisant à la phagocytose par les macrophages, réduisant ainsi la quantité de NPs atteignant la cible, ici, le cerveau. En effet, la forte vascularisation de la muqueuse nasale peut conduire à une diffusion partielle des NPs dans le sang. Il est essentiel de concevoir des NPs capables d'éviter l'opsonisation et la réponse immunitaire pour prévenir les effets secondaires. L'un des moyens de créer ces NPs furtives consiste à fonctionnaliser les NPs avec une molécule, comme des surfactants ou d'autres molécules hydrophiles (88).

a) Surfactants

La nature amphiphile des surfactants est idéale pour améliorer la stabilité et la furtivité des NPs. Tous les surfactants sont composés d'une tête et d'une queue ; d'une partie hydrophile et hydrophobe. En fonction de la charge de leur tête, les surfactants peuvent être répartis en différentes catégories : les surfactants chargés positivement, ceux chargés négativement, ceux zwitterioniques, à la fois chargés positivement et négativement, et ceux non ioniques. Les surfactants non ioniques sont moins toxiques car ils ne sont pas ionisables dans les solutions aqueuses, ce qui en fait les plus utilisés dans les nanotechnologies (89). Leur partie hydrophobe reste en contact avec le cœur des NPs lorsque leur partie hydrophile reste dans l'eau. L'adsorption d'un surfactant à la surface des NPs ou l'ajout de surfactants dans la synthèse des NPs peut également avoir un impact sur la stabilité mais aussi sur les caractéristiques physicochimiques des NPs. Il a été prouvé, par exemple, que la modification de la longueur de la queue du surfactant peut entraîner une modification de la taille des NPs, elle peut également limiter l'aggrégation des NPs, améliorant ainsi leur stabilité (90).

Les **poloxamères** sont des surfactants non ioniques composés de poly(oxyde d'éthylène) hydrophile et de poly(oxyde de propylène) hydrophobe, dont les proportions peuvent varier. La partie hydrophobe est en contact avec les NPs tandis que la partie plus hydrophile est plus exposée à la surface des NPs (91). Grâce à leurs structures en trois blocs, ils forment une couche hydrophile à la surface des NPs limitant ainsi l'opsonisation et créant donc un effet de furtivité (89). L'utilisation des poloxamères permet également d'inhiber la glycoprotéine P, qui est un transporteur actif d'efflux, ce qui peut limiter l'expulsion de la nanoparticule hors de la cellule (92). Il a également été prouvé que l'adsorption du poloxamère 188 à la surface des NPs augmentait la stabilité en raison de forces répulsives à la surface des NPs (93). D'autres études ont démontré que les NPs enrobées de poloxamère 407 se dispersent plus rapidement dans la couche de mucus que les NPs nues, ce qui limite le contact entre le cœur des NP et le mucus et donc le risque de dégradation par les enzymes qui le composent (94). De plus, les NPs enrobées de poloxamère 188 ont montré une absorption plus rapide et plus importante par les cellules que les NPs enrobées de polysorbate 80 (95). Ces deux poloxamères, 188 et 407, sont tous les deux approuvés à la fois par la FDA et l'Agence Européenne des Médicaments (92).

Comme les poloxamères, le **polysorbate 80** (ou Tween 80) est un tensioactif non ionique souvent utilisé pour stabiliser les NPs (96). Il a également été prouvé que le polysorbate 80 cible le cerveau, ce qui augmente la biodisponibilité du médicament encapsulé (97).

Le **succinate de D- α -tocophérol polyéthylène glycol 1000** (TPGS) peut également être utilisé comme surfactant. Il est dérivé de la vitamine E et du polyéthylène glycol (PEG). Il peut être utilisé comme émulsifiant, stabilisateur et protecteur des micelles. Comme il est complètement miscible avec l'eau et l'huile, il est largement utilisé pour ses propriétés de stabilisation. Il convient de noter que le TPGS peut également inhiber la glycoprotéine P, présente à la surface de la cavité nasale, empêchant ainsi l'efflux à partir de la cellule (98).

La **lécithine** est un surfactant naturel et biocompatible qui possède des propriétés émulsifiantes (71,99). Elle a été utilisée comme stabilisateur et a amélioré l'adsorption des protéines à la surface des NPs lipophiles en créant une monocouche de phospholipides à la surface des NPs, ce qui est connu pour améliorer la biocompatibilité des NPs (100). La lécithine a été ajoutée dans la synthèse des NPs de chitosane et il a été montré que les NPs étaient plus concentrées dans le cerveau que la suspension de médicament après l'administration IN (71).

Les NPs hybrides sont une combinaison d'un cœur de NPs polymériques et d'une couche lipidique composée d'un **lipide** biocompatible et d'un lipide plus furtif. Par conséquent,

ces NPs hybrides ont une grande intégrité structurale, biocompatibilité et biodisponibilité. Leur principal avantage est l'augmentation de la stabilité et du temps de circulation grâce à la biomimétique des lipides. De plus, différents médicaments peuvent être encapsulés, qu'ils soient hydrophiles ou hydrophobes (101).

L'utilisation de surfactants à la surface des NPs polymériques améliore considérablement leur stabilité et leur fonctionnalité, facilitant une meilleure interaction avec les environnements biologiques et empêchant l'agrégation dans l'environnement de la cavité nasale.

b) Polyéthylène glycol

Le **PEG** est l'une des molécules les plus utilisées pour fonctionnaliser les NPs. Il peut être ajouté en tant que revêtement de la surface des NPs ou lié de manière covalente au polymère composant les NPs. Le PEG présente de nombreuses caractéristiques avantageuses : il est biocompatible, biodégradable et peut protéger les nanoformulations de la dégradation biologique et chimique. La PEGylation améliore l'absorption cellulaire des NPs et montre également une stabilité et une transcytose accrues, ce qui améliore l'adsorption à travers la muqueuse nasale. En outre, l'ajout de PEG sur les NPs polymériques confère des propriétés mucoadhésives aux NPs (102). Toutefois, l'encombrement stérique du PEG peut l'empêcher d'interagir avec la membrane cellulaire. Il peut donc être utile d'ajouter des molécules qui peuvent permettre une meilleure absorption cellulaire (103). De plus, bien qu'il s'agisse d'un ingrédient très intéressant pour l'ANC, l'utilisation du PEG dans un système de délivrance de médicament peut déclencher une réaction immunitaire chez le patient. De plus, de nombreux patients présentent des anticorps anti-PEG préexistants. Ces deux facteurs engendrent l'augmentation des réactions d'hypersensibilité associées au PEG (104). Ces effets indésirables peuvent limiter l'utilisation du PEG dans les différents systèmes de délivrance de médicaments, notamment dans un contexte de délivrance du médicament *via* la cavité nasale (105).

c) Autres molécules

L'**alcool polyvinylique** (PVA) est souvent utilisé avec les NPs de chitosane. Il s'agit d'un polymère qui possède à la fois des parties hydrophiles et hydrophobes. Cette molécule présente une répulsion stérique lorsqu'elle est adsorbée à la surface des NPs, ce qui améliore leur stabilité (106).

L'**albumine** peut également être utilisée pour enrober les NPs et améliorer leur stabilité. L'albumine est peu immunogène et biocompatible. Outre leur capacité à cibler les cellules tumorales (107), les NPs enrobées d'albumine présentent une plus grande stabilité et

donc une meilleure biodisponibilité, car la couronne empêche l'opsonisation et l'élimination des NPs (108). Une molécule anticancéreuse reconnue, le paclitaxel, peut être chargée dans une NP à base d'albumine et cette formulation, commercialisée sous le nom Abraxane® est actuellement indiquée dans le traitement des cancers du sein métastatique ou des adénocarcinomes du pancréas métastatiques (109,110)

Enfin, ces molécules peuvent être combinées pour améliorer encore les propriétés des NPs en vue d'une ANC plus efficace. Par exemple, Sekerdag *et al.* ont formulé des NPs en utilisant du PLGA et un médicament anticancéreux dérivé de l'acide salicylique. Ils ont ensuite ajouté de la lécithine, un surfactant naturel, ainsi qu'un lipide mono-cationique et un lipide amphiphile lié au PEG. Quatre heures seulement après l'administration IN de leurs NPs hybrides, le médicament était nettement plus abondant dans le bulbe olfactif que le médicament seul. De plus, il y avait moins de NPs dans le foie et la rate après l'administration IN qu'après l'administration IV, ce qui suggère que l'ajout d'une couche lipidique sur les NPs et l'administration IN ont, non seulement augmenté la concentration du médicament dans le cerveau, mais aussi limité le risque d'effets secondaires potentiels dans la rate et le foie (111).

2. Mucoadhésion

Pour limiter l'impact du mucus et de la clairance mucociliaire, il est possible d'améliorer la mucoadhésivité en utilisant différentes molécules à la surface des NPs polymériques. La mucoadhésion peut être décrite comme l'interaction avec les mucines, tandis que la bioadhésion est l'interaction avec les membranes biologiques (112). Le mucus des fosses nasales étant chargé négativement, la plupart des molécules mucoadhésives sont chargées positivement, ce qui crée des interactions électrostatiques. Grâce à ces interactions, les molécules mucoadhésives permettent un temps de résidence plus long des NPs dans la cavité nasale, augmentant ainsi leur absorption à travers la muqueuse nasale (112).

Le **chitosane** est l'une des principales molécules mucoadhésives utilisées pour l'ANC en raison de ses nombreux avantages détaillés précédemment (voir section **Erreur ! Source du r envoi introuvable.**).

D'autres molécules mucoadhésives ont pu être étudiées, comme la **pectine**, un polysaccharide qui peut être utilisé pour enrober les NPs afin d'améliorer la mucoadhésion (113). L'**alginate** pourrait également être un excellent candidat pour la mucoadhésion car il a déjà été utilisé pour former des NPs avec des lipides (114). D'autres molécules auraient également pu être utilisées pour améliorer l'adhésion à la muqueuse nasale, comme le **carbopol**, la **carboxyméthylcellulose** ou les **polyacrylates** (115).

Des modifications de certains polymères préexistants peuvent améliorer leurs propriétés de mucoadhésion : la fonctionnalisation maléimide, la thiolation, l'ajout d'acrylate ou de méthacrylate peuvent être utilisés (116). Par exemple, Singh *et al.* ont utilisé des NPs de chitosane thiolé pour encapsuler un médicament antidépresseur et ont démontré qu'après administration IN, le traitement était très efficace sur les animaux (117). De même, Gao *et al.* ont développé des NPs composées de maléimide-PEG-PLA. Ils ont montré que leurs NPs se retrouvaient dans le cerveau après une administration IN (118).

3. Mucopénétration

Comme la mucoadhésion présente un grand intérêt pour prolonger le temps de résidence des NPs dans la cavité nasale, une mucoadhésion trop forte peut également ralentir, voire empêcher les NPs d'atteindre le cerveau. Différentes molécules peuvent être ajoutées pour équilibrer la mucoadhésion en limitant les interactions entre les NPs et le mucus (20).

Permettant d'augmenter la furtivité des NPs, comme décrit dans la section II.C.1.b), le **PEG** est également l'une des molécules les plus utilisées pour améliorer la mucopénétration. Pour l'administration IN, le PEG peut être utilisé comme agent de pénétration du mucus, car ses caractéristiques hydrophiles empêchent les interactions avec le mucus, ce qui favorise la diffusion passive des NPs et la pénétration dans le mucus (119).

En résumé, la conception de systèmes utilisés pour l'ANC consiste à trouver le bon équilibre entre la mucoadhésion et la mucopénétration. Même si ces deux propriétés semblent contradictoires, il a été constaté qu'une combinaison de mucoadhésion et de mucopénétration peut être pertinente pour l'ANC (119).

4. Amélioration de la perméation

Après la couche de mucus, les NPs doivent encore traverser la muqueuse olfactive pour atteindre le cerveau, d'où l'importance de l'utilisation de molécules capables d'améliorer la perméation à la surface des NPs. Elles peuvent améliorer la traversée de la muqueuse, soit en améliorant l'absorption cellulaire, soit en permettant un passage plus important à travers les JS. L'absorption cellulaire peut être améliorée en perturbant les membranes ou en utilisant des molécules qui peuvent se lier aux récepteurs et déclencher l'endocytose (120). D'autre part, les polymères cationiques tels que le **chitosane** sont connus pour interagir avec les JS et les relâcher (120). Dans cette section, nous nous concentrerons sur l'amélioration de l'absorption cellulaire, car l'une des voies les plus intéressantes pour l'ANC semble être l'entrée dans les NSO. Cette voie est la plus directe car les autres voies impliquent une libération dans la lamina propria et un risque de perte de NPs dans l'espace extracellulaire (121). Différentes modifications de la surface des NPs peuvent être réalisées comme le montre la Figure 6.

a) Lectines

Les **lectines** sont des glycoprotéines dotées d'un domaine capable de se lier aux saccharides et aux hydrates de carbone de la membrane cellulaire. Cette liaison avec les hydrates de carbone peut induire l'internalisation dans la cellule. Par exemple, la lectine de *Solanum tuberosum* peut se lier spécifiquement à la N-acétylglucosamine qui est abondante dans la cavité nasale, en particulier dans la région olfactive. Elle a été adsorbée à la surface des NP-PEG-PLGA, ce qui leur a permis d'atteindre le cerveau et de diffuser dedans de manière plus importante que les NPs sans lectine (122).

b) Peptides pénétrants cellulaires

Les **peptides pénétrant dans les cellules** (CPP) sont de petites protéines capables de traverser les membranes cellulaires et de transloquer leur chargement directement dans la cellule. Ils peuvent aider les molécules à traverser la muqueuse nasale sans avoir de récepteur spécifique. Ils sont donc très prometteurs pour la fonctionnalisation des NPs polymériques pour l'ANC. Cependant, le principal inconvénient de l'utilisation des CPP est leur instabilité *in vivo* (123). Différents CPP ont été utilisés pour l'ANC, comme le **peptide dérivé du transactivateur de la transcription** (TAT), ou la protamine. Ces molécules ont pu être utilisées sur des NPs pour l'ANC. Kanazawa *et al.* ont utilisé des NPs composées de PCL et de PEG greffées ou non avec le peptide TAT. Après administration IN de ces NPs, ils ont observé que les NPs étaient plus abondantes dans le cerveau 4h après administration lorsqu'elles étaient greffées avec le peptide TAT (124). Des administrations IN de NPs de PEG-PLGA couplées ou non à la protamine ont été réalisées chez des rats et la présence de protamine a augmenté la présence de NPs dans le cerveau (125). Ces CPP peuvent donc être d'un grand intérêt dans le contexte de l'ANC.

c) Ligands de ciblage

Les ligands de ciblage permettent une interaction spécifique avec les récepteurs exprimés sur les cellules d'intérêt. Dans le contexte de l'ANC, en fonctionnalisant les NPs avec des ligands de ciblage, cela permet de faciliter le contournement des barrières physiologiques et diriger plus efficacement les NPs vers les tissus neuronaux, améliorant ainsi la précision et les résultats thérapeutiques.

Les **ligands du récepteur de la transferrine** peuvent être utilisés pour améliorer la pénétration dans les cellules neuronales de la muqueuse nasale. Les récepteurs de la transferrine sont impliqués dans le transport médié par les récepteurs et l'utilisation de leur ligand peut augmenter l'absorption cellulaire. Lorsqu'elles sont adsorbées à la surface des NPs de PLGA, ces transferrines augmentent l'ANC et les effets thérapeutiques du médicament par rapport aux NPs sans modifications de surface (126). D'autre part, Pan *et al.* ont prouvé qu'après administration IN, les NPs modifiées par la **lactoferrine**, qui est également un ligand du récepteur de la transferrine, étaient plus abondantes dans le cerveau que les NPs sans lactoferrine. Les auteurs ont également démontré que la lactoferrine minimise la toxicité sans réduire la biodisponibilité des NPs (127).

D'autres molécules comme la **glycoprotéine 29 du virus de la rage** (RVG29) ont également été utilisées comme ligands de ciblage pour l'ANC. Chung *et al.*, qui ont réalisé l'administration IN de NPs à base de PLGA enrobées de RVG29, ont démontré que 2h après

l'administration, les NPs enrobées de RVG29 étaient significativement plus présentes dans le bulbe olfactif et le cerveau (128).

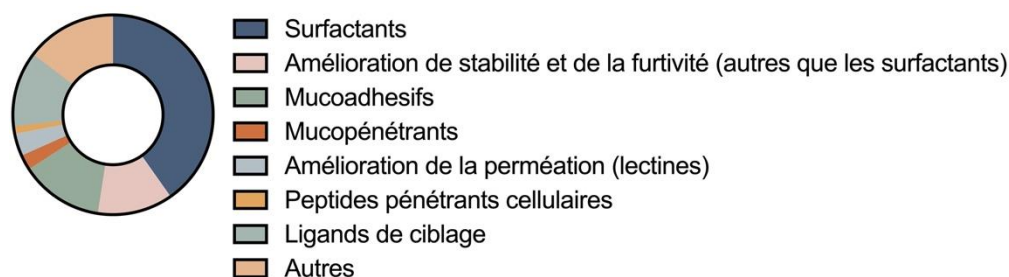


Figure 6 : Fonctionnalisation des NPs polymériques pour l'ANC

D. Caractéristiques physicochimiques

Après avoir examiné la composition des NPs pour l'ANC, nous allons maintenant décrire les caractéristiques physicochimiques des NPs, en nous concentrant sur la taille et la charge de surface, car elles ont un impact important sur leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Toutes les données trouvées sont présentées dans le Tableau 1 et les données retrouvées dans la littérature ont été résumées dans la Figure 7.

1. Taille des nanoparticules

Le passage des barrières biologiques, l'absorption cellulaire, la biodistribution et la cinétique de libération des NPs sont influencés par leur taille (129). Les NPs de moins de 200 nm sont considérées comme des virus et peuvent être internalisées par endocytose médiée par les récepteurs. Ces petites NPs sont plus susceptibles de traverser le mucus et d'atteindre la muqueuse nasale (20). Il a également été démontré qu'elles permettent une traversée meilleure et plus rapide de la muqueuse olfactive (130). Au contraire, les NPs de plus de 500 nm ne devraient pas pouvoir passer dans les pores du mucus, car la taille des pores est d'environ 150 nm (131).

Plusieurs auteurs ont montré que des NPs de moins de 100 nm permettaient d'obtenir une ANC efficace : Kanazawa *et al.* ont synthétisé des NP-PEG-PCL de 80 nm (132) ; Bhattamisra *et al.* ont optimisé des NPs de chitosane de 73 nm (70) ; Veronesi *et al.* ont utilisé des NP-PLA-DPSE de 97 nm (133) ; Seju *et al.* ont développé des NP-PLGA de 91 nm (134) ; et enfin, Ahmad *et al.* ont synthétisé des NPs de chitosane de 92 nm (135). Il a été démontré que les petites NPs ont tendance à se diffuser plus rapidement dans les pores du mucus, ce qui se traduit par une accumulation plus importante dans le cerveau (131). Cruz *et al.* ont également démontré que les petites NPs de PLGA, d'environ 100 nm, pénètrent davantage dans le cerveau que les NPs de PLGA de 200 nm et même que les NPs de PLGA de 800 nm (136).

En revanche, d'autres auteurs utilisant des NPs polymériques de plus de 300 nm ont montré soit une meilleure efficacité, soit une concentration plus élevée dans le cerveau après administration IN : Guo *et al.* ont préparé des NPs de chitosane à 440 nm (137) ; Jain *et al.* ont synthétisé des NP-PLA de 351 nm (82) ; Alex *et al.* ont développé des NP-PCL de 312 nm (138) ; Pan *et al.* ont utilisé des NP-PEG-PLA de 382 nm modifiées avec de la lactoferrine (127). La relation entre les pores du mucus et la taille des NPs n'a pas été discutée dans ces études. Il est possible que les NPs de chitosane, qui sont souvent plus grandes que les autres types de NPs et qui sont chargées positivement, interagissent avec la mucine et peuvent donc se déplacer dans le mucus, se rapprochant ainsi de l'épithélium.

Cette capacité à atteindre le cerveau quelle que soit la taille peut s'expliquer par les voies de transport différentielles en fonction de la taille des NPs (139). Il a également été mentionné que les NPs dont la taille est supérieure à 100 nm (et inférieure à 200 nm) sont plus susceptibles d'être internalisées via une endocytose dépendante de la clathrine. De plus, les NPs plus petites (60–90 nm) peuvent pénétrer dans la cellule grâce à l'endosome recouvert de cavéoline et les NPs dont la taille est supérieure à 200 nm peuvent être internalisées par micropinocytose ou phagocytose (140).

Ainsi, des NPs de tailles très variables semblent pouvoir pénétrer dans la muqueuse nasale et atteindre le cerveau, la taille n'est donc pas la seule caractéristique à prendre en compte pour prédire le passage du nez au cerveau, les charges de surface doivent également être évaluées car elles auront un impact sur l'affinité des NPs avec le mucus et la muqueuse nasale.

2. Charge des nanoparticules

Les NPs chargées positivement ont une perméabilité limitée à travers la couche de mucine chargée négativement de la muqueuse nasale (141). Elles ont également des interactions plus fortes avec le mucus et peuvent utiliser la voie trijumeau pour atteindre le cerveau. La perméabilité limitée et les fortes interactions avec le mucus ralentissent leur cheminement vers le cerveau. Plusieurs groupes ont émis l'hypothèse que les NPs chargées négativement utilisent la voie intracellulaire, via les NSO, et atteignent donc le cerveau plus rapidement. Mais même si cette théorie semble intéressante, il n'existe aucune preuve solide, autre que le timing, pour étayer cette hypothèse (80,131,142).

Bonaccorso *et al.* ont comparé différentes NPs : des NPs de PLGA chargées négativement et des NPs de chitosane/PLGA chargées positivement. Ils ont montré que les deux NPs étaient capables d'atteindre le cerveau mais avec quelques légères différences. Les NPs négatives semblent être transportées via la voie olfactive tandis que les NPs positives

atteignent le cerveau grâce à la voie du nerf trijumeau (143). Muntimadugu *et al.* ont, quant à eux, synthétisé des NP-PLGA et les NPs lipidiques qui étaient toutes deux chargées négativement, ces NPs ont pu atteindre le cerveau (144). Rukmangathen *et al.* ont utilisé des NPs de chitosane chargées positivement, qui conservaient leur activité pharmacologique après administration IN (145).

Cependant, bien que les NPs chargées positivement soient utilisées pour l'ANC, plusieurs études montrent une certaine accumulation dans les poumons après administration IV ou nébulisation, provoquant une réaction inflammatoire (146,147). Il a d'ailleurs été mentionné que l'utilisation des NPs lipidiques cationiques pour le traitement des maladies du cerveau doit se faire avec la plus grande précaution notamment à cause des réactions inflammatoires importantes que ces NPs pourraient déclencher dans le cerveau, certains lipides étant pro-inflammatoires (148).

Enfin, bien que la charge de surface soit également un facteur important pour expliquer la traversée de la muqueuse nasale, ce n'est pas le seul paramètre qui influence l'endocytose et le trafic intracellulaire car il existe de nombreuses autres interactions entre les NPs et les cellules, et toutes ne sont pas basées sur la charge de surface des NPs. En effet, la composition de la membrane cellulaire, l'homéostasie et la couronne moléculaire (corona) qui peuvent se produire autour des NPs peuvent toutes avoir un impact sur la pénétration muqueuse.

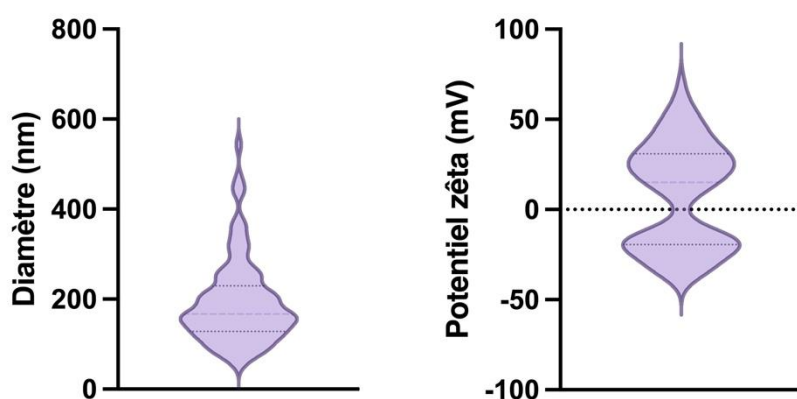


Figure 7 : Caractéristiques des NPs utilisées pour l'ANC, en termes de diamètre et de charge, obtenues d'après les informations trouvées dans 88 articles différents.

III. Intérêt des nanoparticules polymériques dans le traitement des maladies du système nerveux central et leur évaluation

A. Évaluation *in vitro*

Les caractéristiques physicochimiques des NPs influencent considérablement leurs propriétés biologiques, notamment l'absorption cellulaire et la toxicité potentielle (140). Bien que les évaluations générales de la toxicité et de la viabilité cellulaire ne soient pas spécifiques à l'administration IN, cette section met l'accent sur les modèles et méthodes cellulaires qui évaluent l'internalisation des NPs, offrant un aperçu de leur comportement dans le contexte d'une ANC ciblée.

Plusieurs types de modèles sont utilisés pour prédire l'impact d'une nouvelle formulation sur la muqueuse nasale. Comme le montre la Figure 8, les différentes cellules peuvent être cultivées seules dans une culture 2D ou 3D ou avec d'autres types de cellules pour créer des modèles de cocultures.

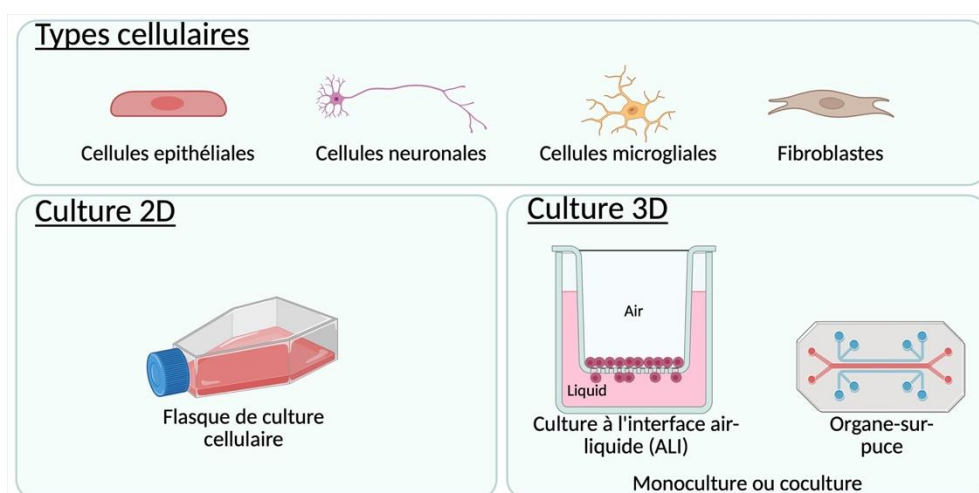


Figure 8 : Évaluation *in vitro* des formulations pour l'ANC.

Créée avec BioRender.com

1. Types cellulaires

Différentes cellules épithéliales peuvent être utilisées *in vitro* afin de démontrer la pertinence des formulations pour l'ANC. La lignée de cellules épithéliales nasales humaines RPMI 2650 est la plus couramment utilisée pour le métabolisme nasal et les essais de viabilité cellulaire (149). D'autres types cellulaires comme les cellules pulmonaires humaines Calu-3, les cellules épithéliales bronchiques humaines 16HBE ou les cellules épithéliales nasales humaines peuvent être utilisées (150,151).

Les NSO primaires pourraient constituer un modèle puissant, mais ils sont difficiles à prélever et à cultiver. A l'inverse, la lignée cellulaire PC12 du phéochromocytome de rat est l'une des lignées cellulaires de précurseurs neuronaux les plus courantes dans la recherche en neurosciences. Au contact d'un facteur de croissance neuronale, ces cellules se différencient et expriment les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules neuronales (152). En outre, cette lignée cellulaire peut être utilisée pour imiter des troubles neuronaux tels que la MA en administrant des peptides bêta-amyloïdes et ainsi tester de nouveaux traitements de cette maladie (153).

Certaines équipes de chercheurs évaluent également leur formulation sur des lignées de cellules du cerveau qui ne sont pas présentes dans la muqueuse olfactive. Par exemple, les cellules microgliales de souris BV-2 ont été utilisées avec succès pour l'étude de la biologie microgliale dans la MA (99,154,155). Des astrocytes humains, isolés d'un cortex cérébral humain, ont également été utilisés, non pas pour évaluer l'effet de la formulation sur la muqueuse olfactive, mais pour évaluer la cytotoxicité plus profondément dans le cerveau (151).

Ces différents types de cellules, utilisés pour les cultures en 2D, permettent d'imiter la composition de la muqueuse nasale et du cerveau. Pour une représentation plus précise de l'environnement nasal, des systèmes de coculture ou des modèles 3D peuvent être utilisés.

2. Modèles *in vitro* et de cocultures

Des modèles de cultures à l'interface air-liquide (ALI) ont été développés pour se rapprocher des conditions physiologiques dans lesquelles la muqueuse nasale est en contact avec l'air inspiré et expiré (Figure 8). Cette technique permet à certains types de cellules de se différencier et de former des JS (156).

Les cellules épithéliales nasales RPMI 2650 peuvent être cultivées à l'ALI et forment une monocouche ayant une intégrité similaire à celle de la muqueuse (157). De plus, il a été mentionné que les cultures ALI permettent aux RPMI 2650 de former plus de JS que la culture en milieu liquide (158). En utilisant des NPs fluorescentes, Schlachet *et al.* ont pu déterminer la quantité de NPs qui traversait la monocouche de RPMI 2650 au fil du temps (151). Ce modèle de culture cellulaire 3D peut être complexifié par l'ajout d'autres types de cellules, par exemple des cellules de glioblastome U87. Une internalisation différentielle entre les deux types de cellules peut alors être mise en évidence par cytométrie en flux (159).

Avec le développement récent des organes sur puce, Gholizadeh *et al.* ont travaillé sur des RPMI 2650 sur puce pour recréer des conditions physiologiques et permettre la

différenciation des cellules. Malgré ses nombreux avantages, dans cette étude, cet organe sur puce est toujours composé d'un seul type de cellules, les cellules épithéliales (160). Des modèles *in vitro* commercialisés peuvent également être utilisés, mais ils sont dépourvus de NSO (161,162). Cela est sûrement dû à la complexité de la culture primaire des NSO, peut-être en raison d'un microenvironnement spécifique et de la difficulté d'obtenir de telles cellules primaires.

Ces modèles cellulaires sont utilisés pour évaluer la viabilité cellulaire (163,164) ou l'internalisation cellulaire en utilisant des NPs marquées et la microscopie et/ou la cytométrie de flux (151).

Malgré l'existence de nombreux types cellulaires et de méthodes de culture différentes, ainsi que de techniques pertinentes pour l'étude de la viabilité et de l'internalisation cellulaire, le fossé entre l'évaluation *in vitro* et l'évaluation *ex vivo* est assez important. Même si différents types de cellules, telles que les cellules épithéliales et neuronales, peuvent être utilisées, il manque encore un véritable modèle de muqueuse olfactive qui pourrait remplacer l'utilisation d'animaux et de tissus animaux.

B. Évaluation *ex vivo*

L'utilisation d'explants de tissus pour l'évaluation de la pénétration des NPs dans la muqueuse olfactive est une amélioration par rapport à l'utilisation de cellules uniquement, car les explants reproduisent mieux l'environnement physicochimique et la coexistence de plusieurs types de cellules qui ne sont pas disponibles sous forme de lignées cellulaires et sont difficilement utilisables en culture primaire (165). Bien que pertinents, ces modèles présentent tout de même quelques limites dues à l'épaisseur de la muqueuse et à l'absence d'écoulement de liquide (149). Dans cette section, nous détaillerons les différents types d'évaluation *ex vivo*, notamment la cellule de diffusion, l'évaluation de la pénétration de la muqueuse nasale et de son intégrité (Figure 9).

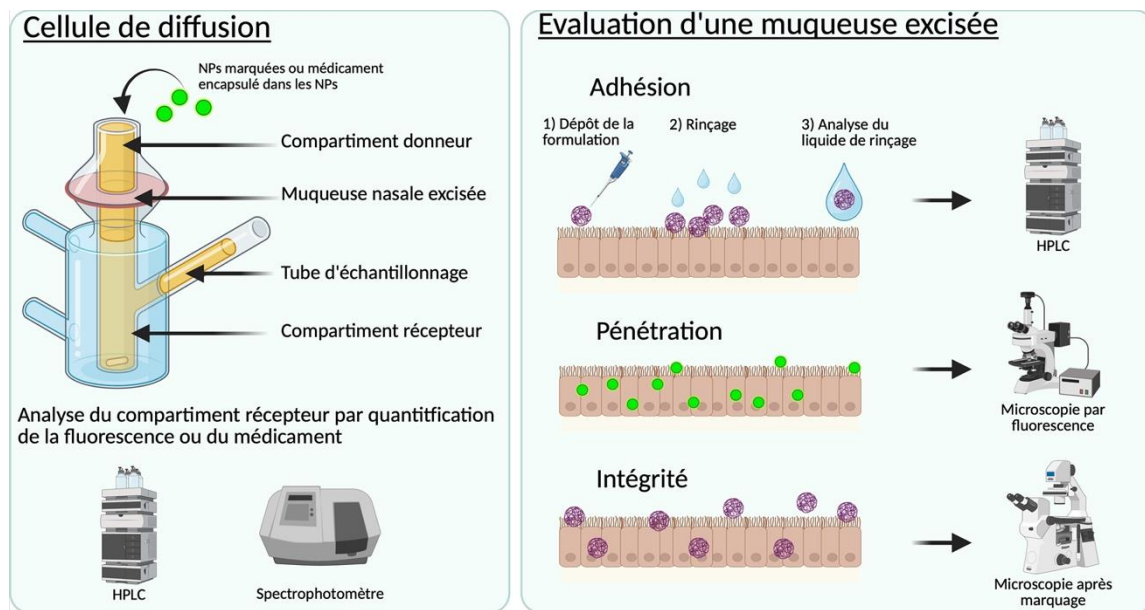


Figure 9 : Évaluation ex vivo des formulations pour l'ANC.

Une cellule de diffusion peut être utilisée pour évaluer la perméation des NPs. L'adhésion, la pénétration et l'intégrité de la muqueuse nasale peuvent être évaluées à l'aide de différentes méthodes, soit directement sur la muqueuse, soit à l'aide d'une cellule de diffusion. Créée avec BioRender.com

1. Modèles ex vivo

a) Organoïdes

A l'interface entre les modèles cellulaires simplifiés et les organismes vivants, les organoïdes pourraient permettre d'être plus proche de l'architecture et de la fonctionnalité de la muqueuse nasale grâce entre autres aux interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire mais aussi aux gradients moléculaires (166). Les organoïdes reposent sur la culture *in vitro* de cellules souches ou progénitrices. Ces cellules se différencient ensuite pour donner les cellules de l'organe grâce à un concentré de facteurs de croissance. Les cellules sont ainsi capables de reformer un tissu physiologiquement fonctionnel (167).

Il a été montré par ailleurs que les neurones de l'épithélium olfactif étaient capables de se régénérer tout au long de la vie grâce à des cellules souches (168). Cette caractéristique est très intéressante pour la culture d'organoïdes (167).

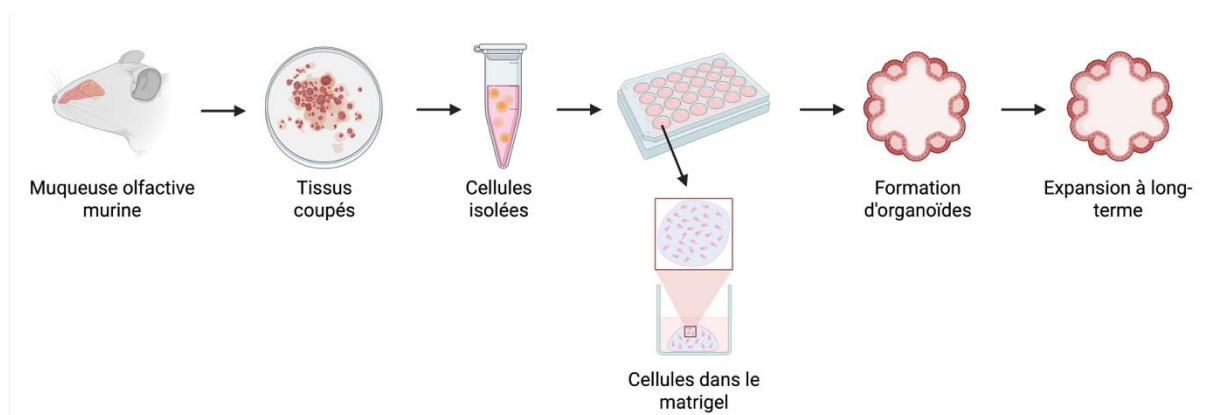


Figure 10 : Protocole de culture d'organoïdes de la muqueuse olfactive (167).

Créée avec BioRender.com

Comme montré dans la Figure 10, à partir des tissus murins ou humains, les cellules sont isolées et mises en culture dans une matrice. Des organoïdes peuvent se former et sont capables d'exprimer des marqueurs de cellules souches (Lgr5) et des marqueurs neuronaux (NCAM1, NGFR, OMP). A l'heure actuelle, ces organoïdes sont principalement utilisés pour étudier les mécanismes cellulaires de l'épithélium olfactif, mais ils pourraient être également utilisés pour étudier des médicaments et donc les NPs pour l'ANC (167).

b) Muqueuses excisées

Actuellement, l'analyse des NPs développées pour l'ANC se fait surtout grâce à des tissus *ex vivo*. La muqueuse nasale excisée d'animaux est utilisée dans la grande majorité des cas (169), car il est extrêmement difficile d'obtenir ce type de tissu lors d'interventions chirurgicales chez l'humain. La muqueuse nasale de chèvre (170–178) est la plus utilisée, sa morphologie étant très comparable à la muqueuse nasale humaine (179). Les muqueuses nasales de mouton sont également largement utilisées (134,180–182) mais également celles de lapin (96,127,183), de porc (184–187), de bovin (188,189) ou de chameau (190). Il est à noter que les expériences peuvent être également réalisées sur des muqueuses excisées après des expérimentations *in vivo*.

2. Cellule de diffusion

Différents dispositifs peuvent être utilisés pour étudier les muqueuses excisées au contact des NPs, notamment la cellule de diffusion. Cette dernière est composée de trois parties principales : le compartiment donneur où la formulation étudiée est appliquée ; le compartiment récepteur contenant un fluide ; et entre les deux, la muqueuse nasale (191). Ce type de dispositif peut être utilisé pour évaluer à la fois le fluide récepteur et la muqueuse après contact avec la formulation. Cette analyse peut être effectuée en dosant le médicament lui-même, par chromatographie liquide haute performance (HPLC) par exemple (173). Le but principal de l'utilisation d'une cellule de diffusion est d'obtenir des informations sur le passage du médicament dans la muqueuse. Ces études sont souvent réalisées au cours du temps afin d'avoir des informations supplémentaires sur la rapidité de ce passage.

3. Adhésion et pénétration de la muqueuse nasale

Les propriétés d'adhésion des formulations peuvent être évaluées directement sur une muqueuse nasale excisée, en plaçant la formulation sur la muqueuse et en la lavant. Le liquide de lavage peut être analysé pour déterminer indirectement la quantité de NPs ou de médicament qui a adhéré à la muqueuse nasale (96). Cette technique peut également être utilisée pour évaluer le temps de résidence de la formulation afin d'estimer sa résistance à la clairance mucociliaire (192). La capacité de pénétration des NPs peut également être évaluée en utilisant la microscopie confocale et des fluorophores (73,82). L'utilisation de muqueuses nasales excisées pour évaluer la pénétration des NPs dans les tissus est un moyen pertinent d'obtenir des informations sur la localisation des NPs dans les cellules. Cela permet également d'avoir un modèle plus robuste comparé à la culture cellulaire 3D qui peut être moins représentative car elle n'inclut pas, pour l'instant, tous les différents types de cellules dans la culture cellulaire.

4. Intégrité de la muqueuse nasale

Après l'évaluation de la perméabilité, l'intégrité de la muqueuse nasale excisée peut également être évaluée. Pour ce faire, elle peut être sectionnée et colorée à l'hématoxyline et à l'éosine. Des modifications histologiques de l'épithélium peuvent être observées, en particulier une desquamation superficielle, une inflammation, une rupture de l'épithélium ou une nécrose cellulaire, voire une détérioration des cils (171).

En conclusion, l'évaluation *ex vivo* permet d'utiliser un modèle plus robuste pour évaluer la diffusion à travers la muqueuse nasale ainsi que l'adhésion et l'intégrité des tissus. L'étape suivante de l'évaluation des NPs pour l'ANC est l'évaluation *in vivo*.

C. Évaluation *in vivo*

L'évaluation *in vivo* chez l'animal est indispensable avant tout essai clinique. Le choix des modèles animaux, la méthode d'administration, le volume et le protocole sont déterminés en fonction de la maladie à traiter et des résultats attendus. La pharmacocinétique (PC) et la pharmacodynamique (PD) peuvent être évaluées pour suivre le devenir du médicament dans l'organisme et pour évaluer l'activité du médicament sur le traitement de la maladie. Dans cette section, nous approfondirons les méthodes *in vivo* d'évaluation de l'ANC des NPs polymériques thérapeutiques.

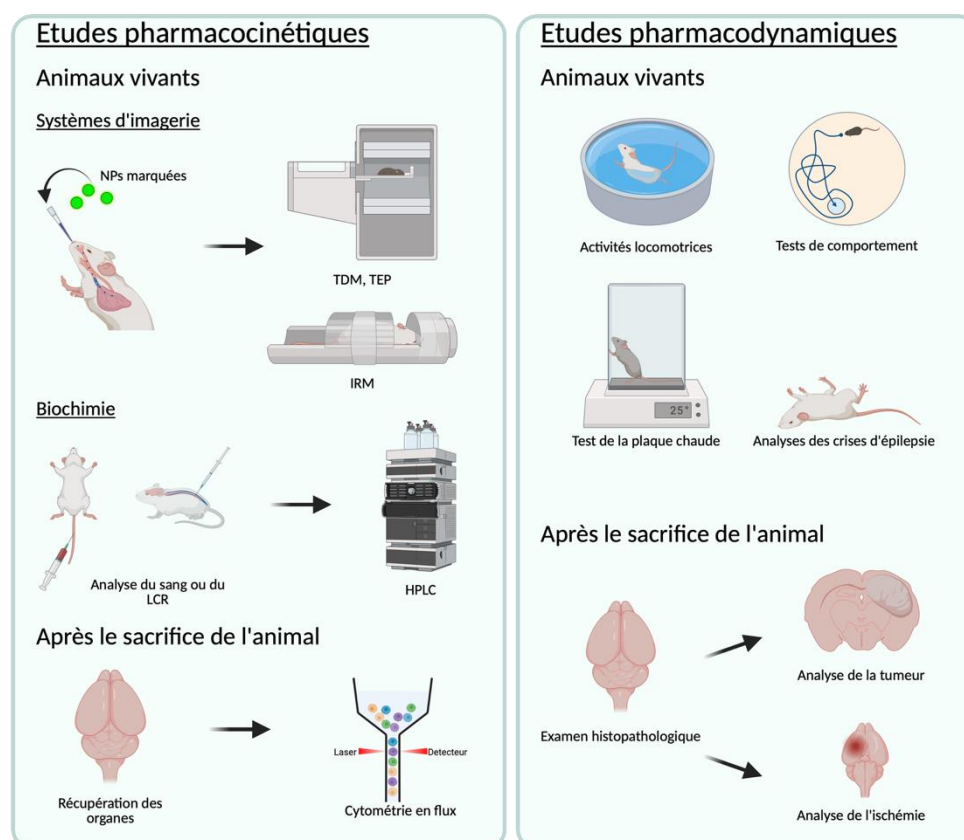


Figure 11 : Évaluation *in vivo* des formulations pour l'ANC.
Créée avec BioRender.com

1. Modèles animaux et anatomie de la cavité nasale

L'évaluation *in vivo* est nécessaire pour compléter l'analyse de la formulation car elle permet de déterminer les caractéristiques PC et PD (Figure 11). L'anatomie de la cavité nasale est cruciale lors du choix d'un modèle *in vivo* en raison des différences qui existent entre l'humain et l'animal. Par exemple, les rongeurs présentent des différences anatomiques qui modifient la trajectoire du flux d'air en direction de la muqueuse olfactive, ce qui n'est pas le cas chez l'humain. De plus, 20 % de l'air inhalé passe par la région olfactive chez les rongeurs, alors que ce chiffre tombe à 3 % chez l'humain (193,194). Enfin, la région olfactive représente

50 % de la surface de la cavité nasale chez les rongeurs, contre 10 % chez l'humain (149). Il pourrait donc être plus probable que les NPs empruntent la voie olfactive directe chez les rongeurs. Cependant, les rongeurs peuvent tout de même fournir des données pertinentes pour étudier les processus biologiques et l'efficacité des médicaments *in vivo*. C'est pourquoi les rats et les souris sont les modèles animaux les plus utilisés pour l'ANC (195), même si les singes semblent plus proches des humains d'un point de vue anatomique (193).

2. Administration

Lors de l'administration de médicaments à des rongeurs pour l'évaluation de l'ANC, différentes caractéristiques doivent être prises en compte : le volume d'administration, l'état de conscience des animaux et les dispositifs utilisés pour administrer le produit.

a) Volume d'administration

Même si le volume de la cavité nasale du rat est de 260 μL à 400 μL (194) et de 32 μL pour la souris (196), différents volumes d'administration sont documentés dans la littérature, les plus courants étant 20 μL (182,197,198) ou 100 μL (132,199,200) chez la souris. Ces volumes sont souvent répartis entre les deux narines. Des études ont montré que le volume instillé dans le nez peut avoir un impact sur la distribution de la formulation dans la cavité nasale (201). Plus le volume est important, plus le produit a de chances d'atteindre les poumons et pas seulement la région olfactive de la cavité nasale (201).

b) Anesthésie

Même si les formulations peuvent être administrées à des animaux conscients (202), le plus souvent une anesthésie est réalisée par injection intrapéritonéale de médicaments (132,192). Elle peut également être réalisée à l'aide d'anesthésiques par inhalation tels que l'isoflurane (86). De même que pour le volume administré, il existe de nombreuses différences d'anesthésie entre les études, mais il n'y a pas de différence en termes de répartition dans les organes ni dans la cavité nasale (201).

c) Dispositif d'administration intranasale

Différents dispositifs peuvent être utilisés pour l'ANC chez les rongeurs. Le plus utilisé est la micropipette, où des gouttes sont déposées à l'entrée du nez. Ces gouttes sont ensuite inhalées pendant la respiration normale de l'animal (71,203). Les principaux avantages de cette technique sont le caractère non invasif et l'inhalation qui est très proche de ce qui peut se passer chez l'humain. Cependant, si le volume est trop important, ou si l'animal est conscient, cela peut conduire à une déglutition et un biais d'administration.

Un dispositif plus ciblé peut être utile pour maximiser le contact entre la formulation et la muqueuse olfactive. A cette fin, plusieurs auteurs ont utilisé un cathéter relié à une micropipette ou à une seringue pour administrer très localement un plus petit volume (137,144). Cette technique limite le risque de déglutition ou de dépôt pulmonaire (204). Néanmoins, l'administration par micropipette est moins invasive et moins dommageable pour la muqueuse nasale que l'insertion d'un tube dans la narine du rongeur (205).

Ces divergences de méthodes d'administration peuvent être la cause de l'hétérogénéité observée en termes de temps de rétention dans la cavité nasale ou même de concentration de médicament atteignant le cerveau (206). De plus, chez l'humain, le spray nasal est largement utilisé, les méthodes actuelles d'administration chez la souris ne sont donc pas facilement extrapolables en clinique (41,207).

Les différentes méthodes utilisées pour l'administration nasale chez les modèles animaux présentent une hétérogénéité significative, reflétant des différences dans les techniques, les volumes administrés et les dispositifs d'administration qui peuvent influencer les résultats et la comparabilité des études.

3. Évaluation de la toxicité

Il est également nécessaire d'évaluer la toxicité des formulations *in vivo*. Par exemple, des NPs de PCL (192) ou de chitosane (208) ont été administrées aux animaux, ces dernières pouvant être vides ou contenir un médicament. La muqueuse nasale a été observée *post-mortem* après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine pour rechercher des anomalies similaires à ce qui a été décrit dans la section III.B.4. Une analyse des marqueurs d'inflammation aurait pu être réalisée pour obtenir des informations plus précises sur l'inflammation de la muqueuse nasale après l'administration IN des NPs, par exemple, l'expression d'interféron ou d'interleukine (209).

4. Étude de la pharmacocinétique

L'étude de la PC des NPs après administration IN peut être réalisée à l'aide de plusieurs techniques sur des animaux vivants ou après euthanasie (210).

a) Sur les animaux vivants

L'utilisation de l'imagerie pour évaluer les nouvelles formulations pour l'ANC est un outil intéressant, car les NPs peuvent être utilisées comme agents d'imagerie. À cette fin, plusieurs techniques peuvent être utilisées : par exemple, l'IRM permet une résolution spatiale considérable ainsi qu'une sensibilité importante mais elle reste assez coûteuse. La

tomodensitométrie (TDM) peut, quant à elle, fournir une forte résolution spatiale et est relativement peu coûteuse (211). L'imagerie par fluorescence est la modalité la plus utilisée, grâce à plusieurs avantages dont son faible coût, sa facilité d'utilisation, sa grande sensibilité et le fait que le signal est obtenu très rapidement. L'un de ses principaux inconvénients est sa faible capacité de pénétration et la présence d'une autofluorescence à certaines longueurs d'onde (204). Différentes solutions existent pour éviter ce bruit de fond, notamment le choix d'une longueur d'onde au-dessus de 750 nm et l'utilisation d'un régime purifié au chlorophylle (212).

Différentes sondes fluorescentes peuvent être utilisées. Par exemple, le DiR est un colorant fluorescent à base de cyanine qui est excité à 748 nm et émet à 780 nm. Il s'agit de la sonde fluorescente la plus courante pour les études de biodistribution. Certains auteurs ont comparé leurs formulations avec soit la sonde fluorescente libre, soit leur formulation sans la fonctionnalisation de surface (213,214), ou pour choisir entre leurs différentes formulations (76,215).

Pour pallier aux inconvénients des modalités d'imagerie prises séparément, une solution innovante consiste à utiliser des images combinées de différentes modalités. Ces techniques combinées peuvent être par exemple, l'association de la TDM avec la tomographie par émission de positons (TEP), avec des NPs radiomarquées au zirconium (^{89}Zr). Néanmoins, les chercheurs ont également mentionné la difficulté d'obtenir une localisation cérébrale sous-régionale des NPs (133).

Le principal avantage de l'utilisation des techniques d'imagerie, seules ou combinées, sur des animaux vivants est la facilité de suivre les NPs au cours du temps dans le corps de l'animal. Mais le principal inconvénient de ces techniques est le manque d'informations précises sur la localisation. En raison de l'anatomie nasale, il est souvent difficile d'évaluer si les NPs se trouvent encore dans la cavité nasale ou dans le bulbe olfactif du fait de leur proximité. Mais les informations sur l'élimination des NPs de la tête ou la perte de formulation dans le tube digestif peuvent faire l'objet d'un suivi. L'imagerie plus fine des organes ou le dosage des agents de contraste dans le cerveau ou le sang peuvent être des compléments pour obtenir ces informations de localisation (216).

b) Post-mortem

Comme indiqué précédemment, les agents d'imagerie peuvent être facilement encapsulés dans les NPs polymériques afin de réaliser des analyses plus poussées. Après l'administration IN de NPs encapsulant des radiomarqueurs ou des agents d'imagerie fluorescents, des échantillons de sang peuvent être prélevés et dosés et les organes, y compris

les cerveaux, peuvent être analysés (30,197,216,217). Cela peut également être un avantage d'utiliser cette technique avant et après l'euthanasie. De la même manière, la fluorescence peut également être quantifiée dans des organes entiers (103,122,218,219) ou dans des cerveaux homogénéisés (132). Les tissus des organes ont également été analysés à l'aide de la cytométrie de flux pour évaluer la proportion de cellules ayant internalisé les NPs fluorescentes (220).

En conclusion, l'évaluation du profil PC des NPs sur les animaux vivants est facilitée par la possibilité d'encapsuler des agents d'imagerie. Différents systèmes d'imagerie peuvent être utilisés pour obtenir des informations sur la localisation des NPs et parfois sur leur concentration, ce qui constitue en soi l'un des principaux avantages de l'utilisation des NPs polymériques. Après la mort des animaux, d'autres informations peuvent être obtenues en utilisant les organes pour le dosage du médicament ou la microscopie. Bien que l'on dispose d'informations sur la localisation et/ou la concentration du médicament dans différentes parties du corps, il reste une question à résoudre, à savoir l'effet des NPs sur le corps.

5. Étude de la pharmacodynamique

Les études PD sont essentielles pour évaluer les effets du médicament sur l'organisme et sont généralement réalisées à l'aide de modèles animaux. Ces expériences sont soigneusement adaptées pour correspondre à la pathologie étudiée, aux résultats thérapeutiques et aux mécanismes d'intérêt. Cette approche ciblée garantit que les aspects uniques de chaque maladie et les actions prévues des médicaments sont représentés avec précision, ce qui permet d'obtenir des informations essentielles sur l'efficacité des médicaments et d'optimiser les stratégies de traitement. Dans cette section, nous explorerons les critères clés couramment évalués dans le contexte des pathologies cérébrales.

Par exemple, pour l'étude des tumeurs cérébrales, Kanazawa *et al.* ont administré leurs NP-PEG-PCL fonctionnalisées avec le peptide pénétrant TAT et ont estimé la croissance de la tumeur sur des coupes de cerveau (132). Dans le contexte des maladies neurodégénératives, des tests comportementaux et des examens histopathologiques sont souvent réalisés. Dans le cas de la maladie de Parkinson, des mesures de biomarqueurs dans le tissu cérébral peuvent être effectuées (70,173,221).

Le type d'évaluation de la PD peut également dépendre du type de médicament utilisé. Par exemple, un petit ARN interférent (ARNsi) a été développé et encapsulé dans des NPs de chitosane pour traiter la maladie de Huntington. Des expériences d'inhibition des gènes dans le cerveau à l'aide de cet ARNsi ont été réalisées et évaluées par qPCR pour mesurer son potentiel thérapeutique (222).

Outre la démonstration de l'efficacité du traitement sur la maladie spécifique ciblée, l'évaluation des effets secondaires et en particulier de la toxicité doit être effectuée pour garantir la pertinence du traitement et la possibilité de passer à l'évaluation clinique.

En conclusion, l'évaluation PD des NPs administrées par voie IN est aussi variée que les maladies qu'elles traitent. Néanmoins, cette évaluation est extrêmement pertinente pour évaluer l'efficacité du traitement. L'évaluation *in vivo* est essentielle pour démontrer la pertinence de tout traitement.

IV. Les maladies du cerveau

Il existe deux grands types de traitements dans les pathologies du système nerveux central, les traitements symptomatiques et les traitements étiologiques. En recherche, deux axes de développement existent parallèlement, l'amélioration de l'efficacité de traitements existants ou le développement de nouveaux traitements. L'amélioration de traitements déjà existants est souvent optimisée grâce aux NPs et à l'administration IN, pour maximiser la concentration en médicament dans le cerveau et donc son efficacité. De nouveaux traitements sont également mis au point pour être encore plus efficaces que ceux qui existent déjà. Malheureusement, l'évaluation clinique n'est pas toujours réalisée et nous manquons d'informations sur l'efficacité du traitement.

Plusieurs essais cliniques ont déjà été publiés et d'autres sont toujours en cours pour évaluer la possibilité d'utiliser l'ANC pour différents médicaments tels que l'insuline ou la vasopressine (223). A ce jour et à notre connaissance, un seul essai clinique mentionne l'administration IN des NPs mais aucun détail concernant le type de NPs utilisées n'a été spécifié dans cet essai clinique de phase II (224). D'autres médicaments sont encore au stade préclinique et concernent des maladies cérébrales comme les maladies neurodégénératives, l'épilepsie, les maladies mentales, les accidents vasculaires cérébraux et les tumeurs cérébrales (225).

Différentes maladies peuvent être ciblées par des traitements à base de NPs via une ANC. C'est le cas par exemple de la MA, pour laquelle des médicaments commercialisés comme le tarenflurbil ou la vinpocétine ont été chargés avec succès dans des NPs polymériques (respectivement NPs de lécithine/chitosane, PLGA et chitosane) et ont été retrouvés en plus grande quantité dans le cerveau que le médicament libre après l'administration IN (144,197,208). La maladie de Parkinson est également une cible des NPs pour une administration IN. La lévodopa, le traitement le plus utilisé, a été chargée dans des NPs de chitosane puis incorporée dans un hydrogel thermoréversible. Après administration IN

chez le rat, la lévodopa a été largement retrouvée dans le cerveau, mais aucun essai d'efficacité du traitement n'a été réalisé (226).

Les cancers du cerveau sont également ciblés, pour réduire les effets secondaires de la chimiothérapie. La camptothécine est un médicament anticancéreux commercialisé qui a été chargé dans des NP-PEG-PCL fonctionnalisées avec un peptide pénétrant dans les cellules (TAT). L'ANC a été évalué chez des rats atteints de gliomes et a produit un effet thérapeutique supérieur à celui du médicament libre (132).

D'autres maladies comme l'épilepsie, la dépression, la schizophrénie, l'ischémie cérébrale ou les migraines peuvent être étudiées pour l'ANC de NPs thérapeutiques (190,192,200,227,228).

V. Conclusion

Le traitement des maladies cérébrales est un défi, en grande partie à cause de la BHE. L'ANC est une stratégie prometteuse pour contourner cette barrière. En raison de l'anatomie nasale, de la muqueuse olfactive et de la présence de voies allant du nez au cerveau, l'administration IN s'est avérée être un outil efficace pour obtenir une biodisponibilité cérébrale élevée avec une efficacité conservée des médicaments administrés. En plus d'être une voie directe vers le cerveau, indolore et non invasive, l'administration IN réduit le risque d'effets secondaires liés au passage systémique. Néanmoins, la protection du médicament lui-même est essentielle en raison du mucus, de la clairance mucociliaire ou des enzymes nasales et c'est pourquoi les NPs polymériques constituent une stratégie très prometteuse pour véhiculer le médicament (protection du médicament, internalisation par les cellules et ciblage optimisé pour atteindre leur objectif). Ainsi, l'optimisation des NPs est un enjeu majeur dans la conception d'un traitement voué à être administré par le nez.

Dans ce premier chapitre, les principales caractéristiques de cette conception ont été établies : le choix du polymère, la fonctionnalisation des NPs pour améliorer la furtivité ou la pénétration cellulaire, et les caractéristiques physicochimiques, principalement la taille et la charge, afin d'obtenir un candidat efficace pour l'ANC qui pourra être étudié plus en détail dans les chapitres suivants. Ce candidat pourra être évalué *in vitro* à l'aide de cultures cellulaires en deux ou trois dimensions, notamment grâce aux cellules RPMI 2650 et PC12 mais également *in vivo* évaluant à la fois la PC et la PD. Enfin, les NPs polymériques et l'ANC peuvent être utilisées dans de nombreuses applications, y compris les maladies neurodégénératives ou les tumeurs cérébrales, ce qui a un impact important sur la santé publique.

Malgré l'intérêt croissant et les immenses espoirs suscités par ces NPs innovantes, la voie d'administration IN et les résultats *in vivo* prometteurs, seul un essai clinique est en cours pour des NPs administrées par la voie nasale contre la MA. En effet, la transposition de traitements pour des maladies cérébrales qui affectent directement ou indirectement une grande partie de la population se heurte encore à des difficultés, telles que le choix d'un modèle animal pertinent ou l'absence de modèles *in vitro* pleinement prédictifs, qui pourraient ralentir le développement du médicament et son utilisation au cours d'essais cliniques.

Tableau 1 : Résumé de la composition, des caractéristiques et des méthodes d'évaluation des NPs polymériques utilisées pour l'ANC

Polymère utilisé	Autres molécules	Médicament véhiculé	Méthode de synthèse	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)	Taux de chargement (%)	Efficacité d'encapsulation (%)	Évaluation <i>in vitro</i>	Évaluation <i>ex vivo</i>	Évaluation <i>in vivo</i>	Application	Référence
Alginate	Sodium dodecylbenzènesulfonate	Sérotonine ou 5-hydroxytryptophane	Gélification	220 ± 4					Internalisation cellulaire			Dépression	(85)
Chitosane		Rotigotine	Gélification ionique	75,37 ± 3,37	0,37 ± 0,02	25,53 ± 0,45		96,08 ± 0,01	Internalisation cellulaire Activité neuroprotectrice and antioxydante		Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Maladie de Parkinson	(70)
Chitosane		Chlorhydrate de pramipexole	Gélification ionique	292,5 ± 8,8		14,0 ± 2,9		91,25 ± 0,95	Diffusion du médicament	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Maladie de Parkinson	(173)
Chitosane	Tween 80	Leucine-enképhaline	Gélification ionique	443 ± 23	0,32 ± 0,17	15 ± 2	14,0 ± 1,3	78,3 ± 3,8	Étude de relargage Étude de mucoadhésion	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Douleur	(184)
Chitosane	Glutaraldéhyde Albumine de sérum humain	Sulforhodamine B	Désolvatation-coacervation	267 ± 6	0,12 ± 0,02	44 ± 1		63 ± 1	Étude de relargage Internalisation cellulaire Perméation Effet sur les jonctions serrées	Cellule de diffusion			(183)
Chitosane		Bromocriptine	Gélification ionique	161,3 ± 4,7	0,44 ± 0,03	40,32 ± 2,78	37,8 ± 1,8	84,2 ± 3,5			Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Maladie de Parkinson	(221)
Chitosane		Rutine	Gélification ionique	92,28 ± 2,96	0,206 ± 0,006	31,04 ± 1,91	39,48 ± 3,16	84,98 ± 4,18	Étude de relargage Étude de mucoadhésion	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Ischémie cérébrale et reperfusion	(135)
Chitosane		Dopamine	Gélification ionique	372 ± 81	0,26 ± 0,07	9,3 ± 1,3		54,5 ± 0,7	Étude de relargage		Études pharmacocinétiques	Maladie de Parkinson	(229)
Chitosane		Chlorhydrate de buspirone	Gélification ionique	226,7 ± 2,5	0,483 ± 0,031		49,7 ± 5,5	81,1 ± 2,8	Étude de relargage	Cellule de diffusion Bioadhesion	Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Trouble anxieux général	(189)
Chitosane		Chlorhydrate de ropinirole	Gélification ionique	173,7 ± 2,3	0,39 ± 0,03	32,7 ± 1,5	13,8 ± 1,7	69,6 ± 3,3	Étude de relargage	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Maladie de Parkinson	(185)
Chitosane		Quétiapine fumarate	Gélification ionique	131,08 ± 7,45	0,252 ± 0,064	34,4 ± 1,9		89,93 ± 3,85		Cellule de diffusion Histopathologie	Études pharmacocinétiques	Schizophrénie	(174)
Chitosane	Maisine Labrafac Lécithine	Simvastatine	Autoassemblage	204,5 ± 15,4	0,098 ± 0,040	48,45 ± 4,09		98,52 ± 1,33	Étude de relargage		Études pharmacocinétiques	Maladie d'Alzheimer	(197)
Chitosane		Midazolam	Gélification ionique	241,2 ± 12,3	0,389 ± 0,056		36,45 ± 2,14	88,68 ± 1,22	Étude de relargage	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Épisode convulsif	(175)
Chitosane		Rasagiline	Gélification ionique	151,1 ± 10,3	0,38 ± 0,01			96,43 ± 4,23	Étude de relargage	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Maladie de Parkinson	(170)
Chitosane	Poloxamère 407 Lécithine	Piribédil	Injection de solvants	147,5 ± 7,9	0,291 ± 0,012	18,1 ± 0,6	12,1 ± 0,7	53,5 ± 2,1			Études pharmacocinétiques	Maladie de Parkinson	(72)
Chitosane		Rivastigmine	Gélification ionique	185,4 ± 8,4	0,391 ± 0,065	38,4 ± 2,9	43,4 ± 3,9	85,3 ± 3,5	Étude de relargage	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Maladie d'Alzheimer	(186)
Chitosane		Venlafaxine	Gélification ionique	167,0 ± 6,5	0,367 ± 0,045	23,83 ± 1,76	32,25 ± 1,63	79,3 ± 2,6		Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Dépression	(187)

Chapitre 1 : Caractéristiques et évaluation des nanoparticules polymériques pour une administration efficace du nez au cerveau

Polymère utilisé	Autres molécules	Médicament véhiculé	Méthode de synthèse	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)	Taux de chargement (%)	Efficacité d'encapsulation (%)	Évaluation <i>in vitro</i>	Évaluation <i>ex vivo</i>	Évaluation <i>in vivo</i>	Application	Référence
Chitosane		Lévodopa	Gélification ionique	164,5	0,248	28,3		56,2	Étude de mucoadhésion Étude de relargage		Études pharmacocinétiques	Maladie de Parkinson	(226)
Chitosane		Bromocriptine	Gélification ionique	161,3 ± 4,7	0,44 ± 0,03	40,32 ± 2,78	37,8 ± 1,8	84,2 ± 3,5			Étude de la clairance nasale Études pharmacocinétiques	Maladie de Parkinson	(202)
Chitosane		Sélégiline	Gélification ionique	215 ± 35	0,214 ± 0,041	17,06		70,0 ± 2,7	Étude de mucoadhésion		Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Dépression	(117)
Chitosane		Chlorhydrate de tapentadol	Gélification ionique	201,2 ± 1,5	0,20 ± 0,01	49,3 ± 1,2	17,25 ± 1,38	63,49 ± 1,61	Étude de relargage Étude de mucoadhésion	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Douleur	(176)
Chitosane		Nicardipine	Gélification ionique	439,6 ± 11,9	0,307	21,05 ± 0,48	17,79 ± 4,85		Perméabilité Étude de relargage		Études pharmacocinétiques	Cœdème cérébral	(137)
Chitosane	PVA		Autoassemblage	249 ± 26	0,26 ± 0,01	10 ± 1			Perméabilité Internalisation cellulaire				(151)
Chitosane		siRNA	Gélification ionique	123,6 ± 2,1		47,5 ± 2,7					Études pharmacodynamiques	Maladie de Huntington	(222)
Chitosane	Lécithine	Agomélatine	Émulsification	190	0,337	57,8		98,45	Étude de relargage Étude de mucoadhésion		Études pharmacocinétiques	Dépression	(71)
Chitosane		Dopamine	Nanoprécipitation	258 ± 50	0,48	-32,4 ± 1,6		94 ± 3	Étude de relargage Internalisation cellulaire			Maladie de Parkinson	(230)
Chitosane	Span 80 Tween 80	Iodoisovanilline	Émulsification	141 ± 2	0,23 ± 0,02	-17,4 ± 0,3					Études pharmacocinétiques	Tumeurs cérébrales	(216)
Chitosane		β-galactosidase	Gélification ionique	140 ± 17	0,227 ± 0,045	15,7 ± 1,6		51 ± 4	Internalisation cellulaire				(159)
Chitosane		Oxcarbazépine	Gélification ionique	189,0 ± 16,7	0,32 ± 0,01	31,4 ± 2,6		97,50 ± 0,06	Étude de relargage		Études pharmacodynamiques	Épilepsie	(203)
Chitosane	β-asarone	Astragaloside IV	Gélification ionique	117,8 ± 2,8	0,253 ± 0,013	22,74 ± 3,04	0,14 ± 0,012		Étude de relargage Internalisation cellulaire		Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Sclérose en plaques	(154)
Chitosane		<i>Centella asiatica</i>	Gélification ionique	210,5	0,260	-14,5 ± 2,4				Cellule de diffusion Étude de toxicité ciliaire		Tonique nerveux	(171)
Chitosane	Gomme d'okra	Esculine	Gélification ionique	312,6 ± 0,4		18,3 ± 3,2		43,24 ± 1,31	Étude de relargage Étude de mucoadhésion	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Maladies neurodégénératives	(231)
Chitosane		Zolmitriptan	Gélification ionique	216,13 ± 15,71		25,46 ± 1,51		87,38 ± 1,51			Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Migraine	(227)

Polymère utilisé	Autres molécules	Médicament véhiculé	Méthode de synthèse	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)	Taux de chargement (%)	Efficacité d'encapsulation (%)	Évaluation <i>in vitro</i>	Évaluation <i>ex vivo</i>	Évaluation <i>in vivo</i>	Application	Référence
Chitosane		Vinpocétine	Gélification ionique	130,6 ± 8,4	0,125	40,81 ± 0,11	61,00 ± 0,89	97,56 ± 0,04	Étude de relargage		Études pharmacocinétiques	Maladie d'Alzheimer	(208)
Chitosane		Naringine	Gélification ionique	150			5				Études pharmacodynamiques	Neuroprotection	(232)
Chitosane	Acide stéarique Acide oléique Tween 80	Risperidone	Émulsification	132,7		11,8 ± 2,0	7,6		Étude de relargage	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Schizophrénie	(67)
Chitosane		Galantamine	Gélification ionique	149,2 ± 0,9	0,222 ± 0,005	27,2		88,23 ± 0,69	Étude de mucoadhésion		Études pharmacodynamiques	Maladie d'Alzheimer	(68)
Chitosane	Tween 80 Poloxamère 188	Chlorhydrate de sélégiline	Gélification ionique	63,1	0,201	35,2		74,77 ± 0,31	Étude de relargage Étude de mucoadhésion		Études pharmacodynamiques	Maladie de Parkinson	(145)
PCL		Carboplatine	Émulsification	311,6 ± 4,7	0,21 ± 0,03	-16,3 ± 3,7		27,95 ± 4,21	Étude de relargage	Cellule de diffusion Histopathologie	Études pharmacocinétiques	Tumeurs cérébrales	(138)
PCL	Poloxamère 188 Poloxamère 407	Aripiprazole	Nanoprécipitation	199,2 ± 5,7		-21,4 ± 4,6		69,2 ± 2,3	Étude de relargage	Cellule de diffusion Histopathologie	Études pharmacocinétiques	Schizophrénie	(84)
PCL	PEG	Curcumine	Émulsification	113,3 ± 3,1	0,12 ± 0,03	-14,43 ± 0,25		96,6			Études pharmacocinétiques	Gliomes	(219)
PCL	Captex Span 80 Tween 80	Mélatonine	Nanoprécipitation	166,7 ± 6,3	0,088 ± 0,018	-34,0 ± 5,2		51	Étude de relargage Internalisation cellulaire		Études pharmacocinétiques	Glioblastomes	(218)
PCL	Tween 80	Simvastatine	Émulsification	202,5 ± 18,0	0,12 ± 0,08	-22,2 ± 3,2		99,8 ± 0,7	Étude de relargage	Cellule de diffusion Étude de mucoadhésion		Maladie d'Alzheimer	(96)
PCL	Méthyl méthacrylate and 2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate Triglycéride de moyenne taille	Olanzapine	Autoassemblage	254,9 ± 12,1	0,03 ± 0,01	22,2 ± 1,2	0,489 ± 0,021	99,00 ± 0,05	Étude de relargage	Évaluation du temps de résidence	Études pharmacocinétiques	Schizophrénie	(192)
PCL	Precirol ATO 5 Mono et diglycéride Geleol	Resvératrol Bleu de méthylène	Émulsification	326 ± 24	0,34 ± 0,09	-16,45 ± 2,30		96,8 ± 2,8	Étude de relargage Étude de mucoadhésion	Cellule de diffusion		Neuroprotection	(188)
PCL	Chitosane TPGS	Bromocriptine mésylate	Émulsification	331,0 ± 3,4	0,17 ± 0,26	21,0 ± 3,8	5,5 ± 0,5	87,9 ± 0,9	Étude de mucoadhésion	Cellule de diffusion		Maladie de Parkinson	(172)
PCL-PEG	Tat peptide Bombésine	Camptothécine	Émulsification	79,6 ± 17,1	0,4	8,42 ± 1,35		40,80 ± 3,86	Étude de relargage Internalisation cellulaire		Études pharmacodynamiques	Gliomes	(132)
PCL-PEG	Lactoferrine	NAP (un neuropeptide)	Émulsification	88,4 ± 7,8	0,22 ± 0,03	-23,56 ± 0,96	0,62 ± 0,01	47,61 ± 2,36	Internalisation cellulaire		Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Maladie d'Alzheimer	(103)
PCL-PEG		Bexarotène	Émulsification	120,2 ± 5,0	0,149 ± 0,030	-19,7 ± 3,0		66,8 ± 3,0	Étude de la mucopénétration Internalisation cellulaire		Études pharmacocinétiques	Neuroprotection	(233)

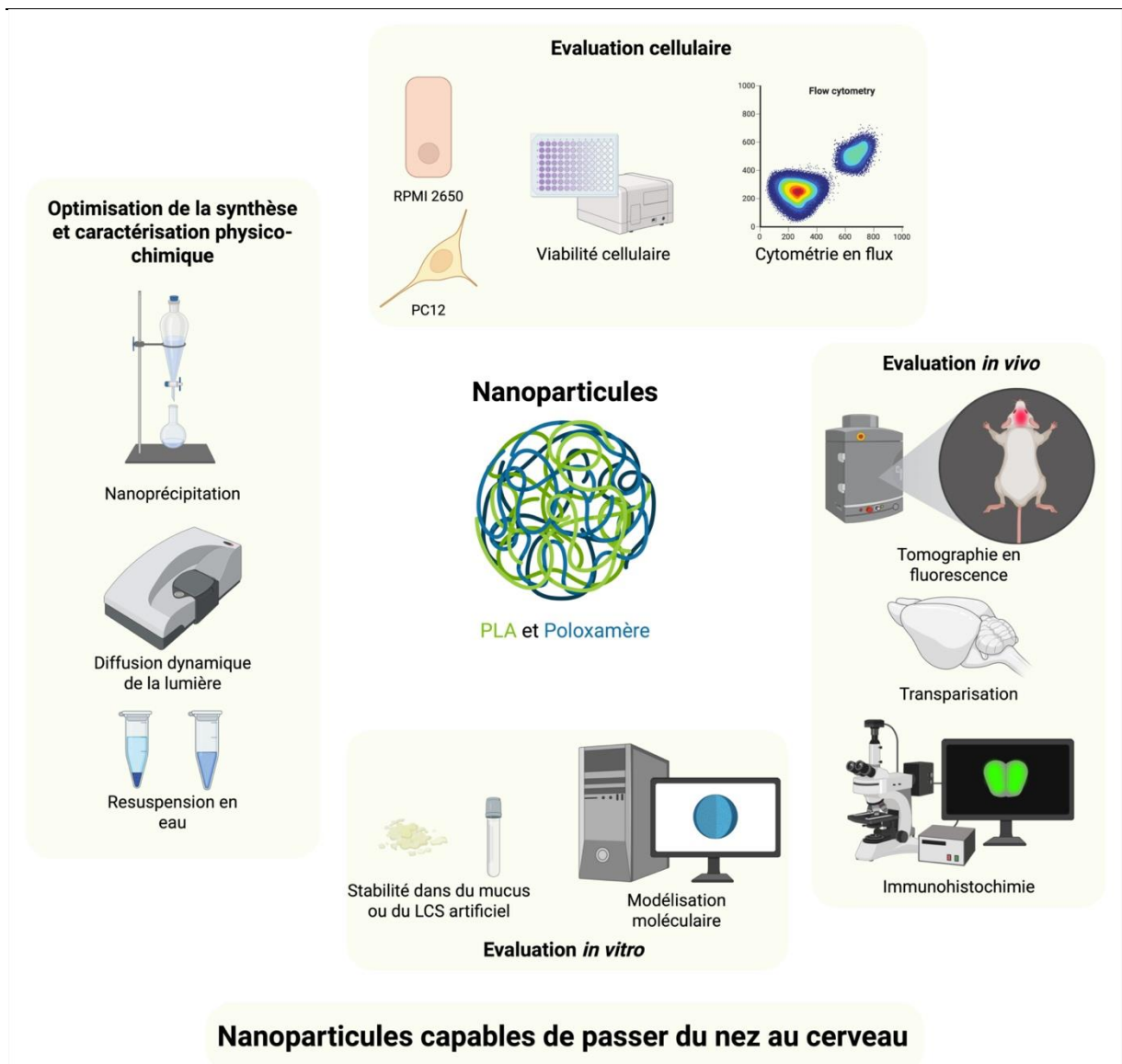
Polymère utilisé	Autres molécules	Médicament véhiculé	Méthode de synthèse	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)	Taux de chargement (%)	Efficacité d'encapsulation (%)	Évaluation <i>in vitro</i>	Évaluation <i>ex vivo</i>	Évaluation <i>in vivo</i>	Application	Référence
PLA	Poloxamère 188	Méthotrexate	Émulsification	351,0 ± 13,4		-25,1 ± 1,2		58,76 ± 0,54	Étude de relargage Étude de mucoadhésion Cellule de diffusion avec une membrane en Nylon	Pénétration dans la muqueuse nasale (fluorescence)	Études pharmacocinétiques	Glioblastomes	(82)
PLA	PVA	Hormone thyroïdienne	Émulsification	108 ± 12					Activité neuroprotectrice		Études pharmacodynamiques	Épisode convulsif	(81)
PLA		Rhodamine	Nanoprécipitation	152,32 ± 7,87	0,087 ± 0,051	-30,05 ± 0,35			Internalisation cellulaire				(80)
PLA-DSPE-PEG		Zirconium 89	Émulsification	97,1	0,19	-36,0					Études pharmacocinétiques		(133)
PLA-PEG	Lectine	Coumarine	Émulsification	111,0 ± 9,8					Étude de relargage		Études pharmacocinétiques		(234)
PLA-PEG	Lectine	Coumarine	Émulsification	85					Étude de relargage Étude de toxicité ciliaire		Études pharmacocinétiques		(118)
PLA-PEG	Lactoferrine	Alpha-asarone	Émulsification	364,5 ± 1,4	0,165 ± 0,017	-21,80 ± 1,01	7,3 ± 0,1	86,34 ± 0,11		Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques Évaluation de la toxicité	Neuroprotection	(127)
PLGA	Poloxamère 407	Lamotrigine	Nanoprécipitation	184,6	0,082	-18,8	10,21 ± 0,89	84,87 ± 1,20	Perméation Analyse des cytokines		Études pharmacocinétiques	Douleur neuropathique	(217)
PLGA	Poloxamère 407	Diazépam	Nanoprécipitation	190,0 ± 0,5	0,31 ± 0,04		11,5	82,0 ± 0,5		Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Épilepsie	(181)
PLGA	Poloxamère 188 Chitosane	Insuline	Émulsification	174,6 ± 10,7	0,179 ± 0,010	58,4 ± 0,7	2,6	78	Étude de relargage Étude de mucoadhésion Diffusion			Maladie d'Alzheimer	(235)
PLGA	Tween 80 Chitosane	Rhodamine	Nanoprécipitation	213,3	0,248	69,40 ± 7,95		10	Étude de relargage		Études pharmacocinétiques		(143)
PLGA	Lécithine DOTAP DSPE-PEG	Acide trans-farneéylthio salicylique	Émulsification	164,3 ± 10,3	0,19 ± 0,06	-12,0 ± 1,3	3,5 ± 0,1	97,7 ± 2,0	Étude de relargage		Études pharmacodynamiques	Glioblastomes	(111)
PLGA	Poloxamère 407	Olanzapine	Nanoprécipitation	91,2 ± 5,2	0,120 ± 0,018	-23,7 ± 2,1	8,613 ± 0,288	68,91 ± 2,31	Étude de relargage	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Schizophrénie	(134)
PLGA	Lactoferrine Chitosane PVA	Huperzine A	Émulsification	153,2 ± 13,7	0,229 ± 0,078	35,6 ± 5,2		73,8 ± 5,7	Étude de relargage Internalisation cellulaire		Études pharmacocinétiques	Maladie d'Alzheimer	(214)
PLGA	Chitosane	Carmustine	Émulsification	232,5 ± 4,5	0,317 ± 0,170	30,8 ± 6,2	11,7	58,76	Étude de relargage	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Glioblastomes	(73)
PLGA	Tween 80 Glucose	Oxcarbazépine	Nanoprécipitation	256,16 ± 2,94	0,144 ± 0,024	-15,12 ± 0,36		85,1 ± 2,1			Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Épilepsie	(200)
PLGA	Poloxamère 188	Tarenfluril	Émulsification	133,13 ± 7,82	0,21 ± 0,02	-30,25 ± 2,11		64,11 ± 2,21	Étude de relargage		Études pharmacodynamiques	Maladie d'Alzheimer	(144)

Polymère utilisé	Autres molécules	Médicament véhiculé	Méthode de synthèse	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)	Taux de chargement (%)	Efficacité d'encapsulation (%)	Évaluation <i>in vitro</i>	Évaluation <i>ex vivo</i>	Évaluation <i>in vivo</i>	Application	Référence
PLGA	Chitosane PVA	Chlorhydrate de ropinirole	Nanoprécipitation	468 ± 40	0,29	54,4 ± 2,6	5,7 ± 2,5		Étude de relargage Étude de mucoadhésion	Cellule de diffusion		Maladie de Parkinson	(106)
PLGA	TPGS	Chlorhydrate de ropinirole	Nanoprécipitation	279,4 ± 1,8	0,329 ± 0,090	-29,4 ± 2,6	9,20 ± 1,65	72,3 ± 6,1	Étude de relargage	Cellule de diffusion Histopathologie		Maladie de Parkinson	(180)
PLGA		Midazolam	Nanoprécipitation	164,0 ± 4,5	0,099 ± 0,02	-16,6 ± 2,5			Étude de relargage	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Épisode convulsif	(236)
PLGA	Span 80	Frovatriptan succinate	Émulsification	264,40 ± 0,04		-35,17 ± 0,07		65,20 ± 0,06	Étude de relargage	Cellule de diffusion Histopathologie	Études pharmacocinétiques	Migraine	(177)
PLGA	PVA Chitosane	Anticorps anti-tyrosine kinase Témozolomide	Émulsification	145,9 ± 8,7	0,121 ± 0,035	23,08 ± 2,50	3,02 ± 0,68		Étude de relargage Internalisation cellulaire		Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Glioblastomes	(76)
PLGA	Transferrine Peptide contre le récepteur de la transferrine	Venlafaxine	Émulsification	218,6 ± 0,5	0,078 ± 0,008	-19,5 ± 0,2	10	48	Étude de relargage Diffusion		Études pharmacocinétiques	Dépression	(220)
PLGA	Peptide contre le récepteur de la transferrine Poloxamère 407	Agomélatine	Nanoprécipitation	116,06 ± 3,52	0,057	-22,7 ± 2,8	49,15 ± 0,5	98,3 ± 1,1	Étude de relargage	Cellule de diffusion Histopathologie	Études pharmacodynamiques	Dépression	(178)
PLGA	Chitosane Poloxamère 407	Cétuximab Acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique	Émulsification	258	0,44	37		88			Efficacité du traitement sur des œufs de poule	Glioblastomes	(164)
PLGA		Baclofène Lamotrigine	Nanoprécipitation	177,7	0,057	-15,8	10,20 ± 1,45	85,29 ± 0,81	Perméation		Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Douleur neuropathique	(30)
PLGA	Tween 80	Ligand induisant l'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale (TNF)	Nanoprécipitation	543,2 ± 15,8	0,304 ± 0,050	-19,10 ± 0,49		99,81 ± 0,03			Études pharmacocinétiques	Maladie d'Alzheimer	(77)
PLGA	Chitosane PVA	Duloxétine	Émulsification	122,11 ± 16,22	0,222 ± 0,050	29,8		66,95 ± 1,48	Étude de relargage	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Dépression	(77)
PLGA	Transferrine Poloxamère 407	Clonidine	Émulsification	199,50 ± 1,36	0,291	-17,40 ± 6,29	7,80 ± 0,48	86,20 ± 2,12	Perméation Internalisation cellulaire	Histopathologie	Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Trouble du déficit de l'attention avec hyperactivité	(126)
PLGA Poloxamère 407	Poloxamère 407	Lorazépam	Nanoprécipitation	168,2	0,08	-18,4	8,7	90,1	Étude de relargage	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Épilepsie	(182)
PLGA-PEG	N-hydroxy succinimide Bornéol	Tanshinone IIA	Émulsification	160		-36	3,6	70	Étude de relargage Internalisation cellulaire		Études pharmacodynamiques	Ischémie cérébrale et reperfusion	(199)
PLGA-PEG	Tween 80	Rhodamine B	Nanoprécipitation	190,2 ± 4,1	0,198 ± 0,024	-21,7 ± 0,3		80,190 ± 8,234	Étude de relargage Internalisation cellulaire				(163)

Polymère utilisé	Autres molécules	Médicament véhiculé	Méthode de synthèse	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)	Taux de chargement (%)	Efficacité d'encapsulation (%)	Évaluation <i>in vitro</i>	Évaluation <i>ex vivo</i>	Évaluation <i>in vivo</i>	Application	Référence
PLGA-PEG	RVG29	miR-124	Émulsification	204	0,4			28,2 ± 8,3			Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Traumatisme cérébral ischémique	(228)
PLGA-PEG	RVG29 Poloxamère 407	Baicaline	Émulsification	89	0,12	-6		64	Étude de relargage		Études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	Ischémie cérébrale et reperfusion	(215)
PLGA-PEG	Lactoferrine	Rotigotine	Nanoprécipitation	122,0 ± 19,3	0,194 ± 0,023	-21,28 ± 2,15		92,57 ± 9,41	Internalisation cellulaire		Études pharmacocinétiques	Maladie de Parkinson	(213)
PLGA-PEG	Lectine	Coumarine	Émulsification	137	0,14	-30	0,79 ± 0,03	65,87 ± 2,85	Étude de relargage Internalisation cellulaire		Études pharmacocinétiques		(122)
PLGA-PEG	Lécithine Tween 80	Edaravone	Nanoprécipitation	90,2 ± 2,2	0,214 ± 0,011	-11,90 ± 1,14	3,02 ± 0,32	20,58 ± 2,18	Étude de relargage Évaluation de l'activité		Études pharmacocinétiques	Sclérose latérale amyotrophique	(99)
Pluronic L121 Pluronic P123		Olanzapine	Hydratation en couche mince	58,55 ± 2,47	0,27 ± 0,03		1,84 ± 0,06	75,03 ± 2,35	Étude de relargage	Cellule de diffusion	Études pharmacocinétiques	Schizophrénie	(237)
Polystyrène	Chitosane			163,0	0,08	30,1 ± 2,0					Études pharmacocinétiques		(86)

CHAPITRE 2

Développement de nanoparticules d'acide polylactique et de poloxamère pour la délivrance du nez au cerveau



Créée avec BioRender.com

Dans un premier temps, l'objectif du projet de thèse a été de synthétiser, d'optimiser et de caractériser des nanoparticules (NPs) polymériques pour l'administration du nez au cerveau (ANC) et de les suivre *in vivo* grâce à des agents d'imagerie. En effet, comme vu dans le chapitre 1, l'ANC permet de contourner la barrière hématoencéphalique (BHE) pour atteindre le cerveau directement. La cavité nasale étant également un point d'entrée des agents pathogènes, de nombreux obstacles sont présents avant d'atteindre le cerveau, notamment la présence de mucus, la clairance muco-ciliaire ou encore les enzymes de dégradation. Un moyen d'éviter ces limites est l'utilisation de NPs polymériques, fonctionnalisées par un surfactant pour permettre d'obtenir une plateforme nanoparticulaire adaptée à l'ANC. De plus, l'étude bibliographique présentée dans le chapitre 1 nous a permis d'établir un cahier des charges de la NP optimale pour cette administration : une taille inférieure à 100 nm, une charge négative, des formulations stables dans le temps et dans différents milieux biologiques, non toxiques pour les cellules et, surtout, être capables de passer de la cavité nasale au cerveau et donc être visibles dans le bulbe olfactif, porte d'entrée du reste du cerveau.

Nous avons donc optimisé la synthèse des NPs polymériques pour qu'elles remplissent les critères physicochimiques développés ci-dessus. La première étape a été le choix des composants de nos NPs, en se basant sur la littérature mais également sur le savoir-faire de l'équipe de recherche ces dernières années (238–242).

L'acide polylactique (PLA) est un polymère composé de molécules d'acide lactique, molécule organique naturellement présente dans le corps humain et métabolisée par les cellules en glucose dans le foie au cours du cycle de Cori. Cet acide lactique peut être polymérisé en PLA par estérification. Ce polymère, biocompatible et biodégradable par hydrolyse en monomères, est très versatile et peut être utilisé pour de nombreuses applications, dans le domaine médical ou non (243). De plus, ses propriétés non toxiques et de faible immunogénicité en font un candidat intéressant pour la formulation de médicaments (244). Le PLA a déjà été utilisé pour l'ingénierie tissulaire, pour des systèmes de délivrance de médicaments, pour des implants ou bien pour des sutures notamment en dermatologie (243).

Malgré des avantages importants, le PLA est très hydrophobe, ce qui peut diminuer l'affinité avec les cellules et engendrer des réactions du système immunitaire. De plus, il ne présente pas de chaîne réactive, ce qui peut rendre difficile sa fonctionnalisation avec d'autres molécules (245). Cependant, sa forte hydrophobicité peut permettre de synthétiser des NPs de PLA (NP-PLA). En effet, au contact d'un milieu aqueux, la chaîne de PLA s'enroule sur elle-même formant les NPs. D'autres part, la présence de groupements carboxylates aux extrémités des molécules de PLA donne à la NP une charge négative. Cette charge peut permettre

I. Synthèse des différents types de nanoparticules

Nous avons donc commencé par optimiser la synthèse des NP-PLA seuls puis des NP-PLA associées aux poloxamères. Nos NPs sont synthétisées par la méthode de la nanoprécipitation (241). Cette technique, également appelée technique par déplacement de solvants, repose sur le principe du dépôt du polymère à l'interface entre deux liquides, l'un hydrophile et l'autre hydrophobe. Le polymère est généralement dissous dans un solvant semi-polaire et organique, tel que l'acétone, le méthanol ou l'acétonitrile. Cette phase organique est mélangée goutte à goutte dans une solution aqueuse pouvant contenir un stabilisateur par exemple. Cette méthode permet d'obtenir des NPs dont la taille est très homogène, et limite l'utilisation de solvants toxiques. La molécule à véhiculer, hydrophobe, est généralement dissoute dans la phase organique (245).

A. Synthèse des nanoparticules d'acide polylactique

Tout d'abord, nous avons souhaité obtenir des NP-PLA avec un diamètre autour de 100 nm. Comme mentionné dans le chapitre 1, une taille de NPs optimale pour le passage du nez au cerveau n'a pas fait consensus, mais dans la littérature, il a été mentionné que le diamètre moyen de l'axone des neurones olfactifs se situe autour de 200 nm (256). Ainsi, une taille de NPs autour de 100 nm nous permettrait de passer facilement le long des axones de ces neurones sensoriels olfactifs (NSO).

Les NP-PLA ont été préparées par nanoprécipitation (241). Le PLA a été dissous dans de l'acétone et précipité dans une phase aqueuse composée soit d'un mélange eau/éthanol, soit d'eau, soit de tampon carbonate de sodium 5 mM sous agitation magnétique (250 rpm) à température ambiante. Les solvants ont été retirés de la solution sous pression réduite et à température contrôlée (30°C) à l'aide d'un évaporateur rotatif. La pression est diminuée par palier afin d'élever toute l'acétone (qui s'évapore à 370 mbar à 30°C) puis la phase aqueuse (l'éthanol s'évapore à 97 mbar et l'eau à 42 mbar à 30°C) comme le montre la Figure 13.

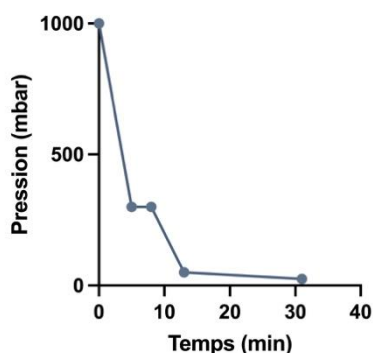


Figure 13 : Évolution de la pression lors de l'évaporation des solvants à 30°C et 150 rpm pour la synthèse des NP-PLA.

La caractérisation des NPs se fait dans un premier temps grâce à la diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Tableau 2 : Optimisation de la synthèse des NP-PLA par la méthode de nanoprécipitation. La synthèse avec un astérisque a été réalisée avec de la verrerie et des liquides à 4°C au moins 1h avant la synthèse (n=1 par ligne sauf la dernière n=3)

Lot de PLA	[PLA] (mg/mL)	Ratio phase organique / phase aqueuse	Composition phase aqueuse	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
DF7	10	1	Eau/éthanol (1:2)	196,5	0,117	-57
CA1	10	1	Eau/éthanol (1:2)	136,6	0,065	-49,8
CA1	20	1	Eau/éthanol (1:2)	170,5	0,081	-35,3
CA1	20	0,5	Eau/éthanol (1:2)	167,8	0,178	-51,1
CA1	10	1	Eau	121,5	0,078	-49,2
CA1	10	0,5	Eau	128,4	0,100	-44,8
CA1*	10	1	Eau	124,3	0,162	-48,3
CA1	10	1	Tampon carbonate 5 mM	<u>87,01</u>	0,114	-54,5

Nous avons dans un premier temps commencé avec la méthode de synthèse habituellement utilisée dans l'équipe (242) qui nous a permis d'obtenir des NPs de 196,5 nm (Tableau 2). Nous avons changé de lot de PLA, ce qui nous a permis de diminuer la taille des NPs obtenues à 136,6 nm. Le but étant d'obtenir des NPs autour de 100 nm, nous avons fait varier la concentration en PLA et le ratio phase organique/phase aqueuse mais les NPs restaient autour de 170 nm. Nous avons ensuite modifié la composition de la phase aqueuse, en enlevant l'éthanol, pour obtenir des NPs de 121,5 nm. Enfin, nous avons modifié à nouveau le ratio phase organique/phase aqueuse ou bien la température de la synthèse en plaçant les liquides et la verrerie à 4°C 1h avant la synthèse mais cela n'a pas permis de diminuer le diamètre des NPs. Nous avons, dans un dernier temps, à nouveau modifié la phase aqueuse pour passer à du tampon carbonate de sodium 5 mM et nous avons obtenu des NPs d'une taille moyenne de 87 nm. Le PDI et le potentiel zêta obtenus ne varient pas en fonction des synthèses, nous ne nous sommes donc pas basés sur ces valeurs pour choisir notre méthode de synthèse.

Suite à ces résultats, nous avons validé une méthode de synthèse optimale avec les paramètres suivants : la concentration de PLA est de 10 mg/mL, la phase aqueuse est composée de tampon de carbonate de sodium 5 mM et le ratio phase organique/phase aqueuse est de 1.

B. Synthèse des nanoparticules d'acide polylactique et de poloxamères

Les NP-PLA-Poloxamère (P188 ou P407) ont été synthétisés à l'aide de deux techniques différentes : une synthèse en une étape et une synthèse en deux étapes. Le but de ces deux synthèses était d'obtenir deux types de NPs différentes : une NP correspondant un mélange homogène de PLA et de poloxamère d'un côté, et une NP avec un cœur de PLA et une couronne de poloxamère à la surface. Nous avons également souhaité comparer différentes concentrations de poloxamère dans la synthèse, allant de 0,5 mg/mL à 20 mg/mL, sachant que la concentration de PLA restait de 10 mg/mL. Cette gamme de concentration nous permettra d'évaluer si l'effet des poloxamères est visible, malgré l'utilisation d'une très faible concentration de poloxamère, ou bien si un excès de poloxamère aboutirait à une double population : des NPs de PLA-Poloxamère et des micelles de poloxamère.

Tout d'abord, pour la synthèse en une étape aboutissant aux NP-PLA-P188 et NP-PLA-P407 « hybrides », la même technique de nanoprécipitation décrite ci-dessus a été utilisée mais dans ce cas le poloxamère a été ajouté au tampon de carbonate de sodium 5 mM à différentes concentrations. Ensuite, pour la synthèse dite « couronne » et appelées NP-PLA-cP188 et NP-PLA-cP407, en utilisant la méthode en deux étapes, les NP-PLA ont été synthétisées exactement comme mentionné ci-dessus. Ces NPs ont été ajoutées goutte à goutte dans une solution de poloxamère dans un tampon de carbonate de sodium 5 mM. Ces solutions ont ensuite été placées sur une roue d'agitation. Toutes ces NPs sont ensuite caractérisées de la même manière que les NP-PLA comme montré dans la Figure 14, la Figure 15 et dans la Figure 16.

Les NPs sont caractérisées par la méthode de DLS. Ces dernières, une fois dispersées dans un milieu, diffusent la lumière incidente proportionnellement à leur rayon. Ainsi, grâce à un laser caractérisé par une longueur d'onde et un angle d'incidence, la lumière diffusée peut être détectée et peut être mathématiquement reliée au diamètre hydrodynamique des NPs. La répartition des tailles des NPs donne une courbe, souvent gaussienne, dont la moyenne est le diamètre hydrodynamique des NPs et dont la largeur est reliée mathématiquement à l'indice de polydispersité (PDI) des NPs et nous donne une information sur l'homogénéité de la taille des NPs. Dans un second temps, la charge des NPs est également une information

essentielle à connaître. Pour cela, le potentiel zêta rend compte de la capacité des NPs à se déplacer lorsqu'elles sont soumises à un courant électrique (257).

En analysant le diamètre des NPs (Figure 14), nous pouvons observer une très légère augmentation du diamètre des NPs lors de l'ajout du poloxamère. Cette augmentation ne semble pas corrélée avec l'augmentation de la concentration en poloxamère dans la synthèse. Les NPs hybrides ont des diamètres compris entre $106,4 \pm 3,5$ nm (NP-PLA-P407 5 mg/mL) et $150,3 \pm 15,6$ nm (NP-PLA-P407 0,5 mg/mL) tandis que les NPs couronnes ont un diamètre qui varie entre $115,1 \pm 14,1$ nm (NP-PLA-cP407 5 mg/mL) et $151,4 \pm 46,9$ nm (NP-PLA-cP407 10 mg/mL).

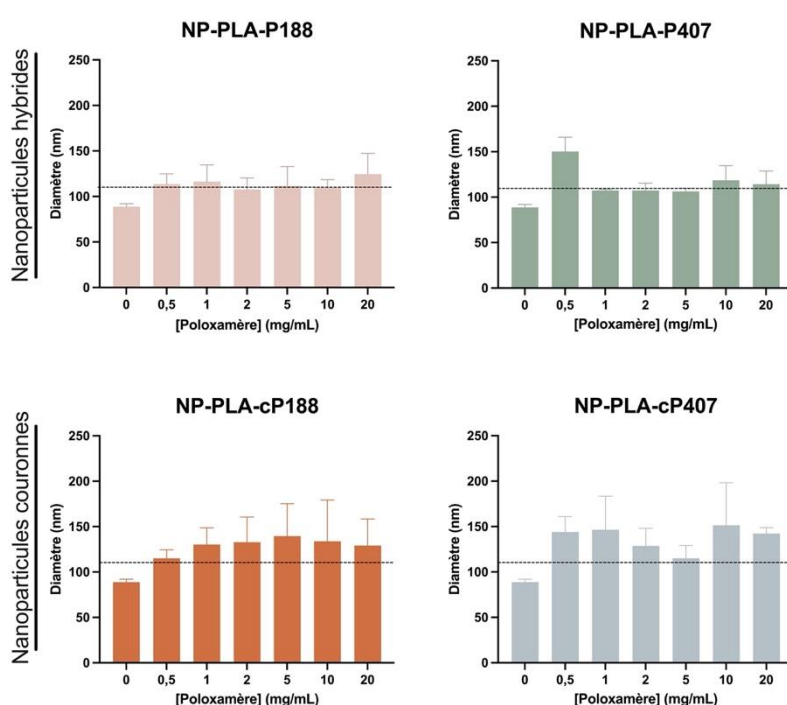


Figure 14 : Mesure du diamètre des NPs contenant différentes concentrations de poloxamère P188 ou P407

($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test ANOVA 2, précédé du test de D'Agostino-Pearson pour vérifier la normalité des données, et suivi du test de comparaisons multiples de Tukey, les NP-PLA sans poloxamère sont utilisées comme référence, aucune différence significative a été retrouvée $p > 0,05$)

En ce qui concerne l'homogénéité des synthèses (Figure 15), lors de l'ajout des poloxamères, le PDI augmente très légèrement par rapport aux NPs sans poloxamères et cela quel que soit la nature ou la concentration de poloxamères. Il varie entre $0,123 \pm 0,011$ (NP-PLA-P407 5mg/mL) et $0,268 \pm 0,049$ (NP-PLA-P407 0,5 mg/mL) pour les NPs hybrides, et entre $0,176 \pm 0,055$ (NP-PLA-cP407 5 mg/mL) et $0,331 \pm 0,085$ (NP-PLA-cP407 0,5 mg/mL). Seules les NPs contenant 0,5 mg/mL de P407 ont vu leur hétérogénéité augmenter significativement.

Nous nous sommes fixés un seuil de 0,2 au-dessus duquel nous considérons nos NPs comme hétérogènes.

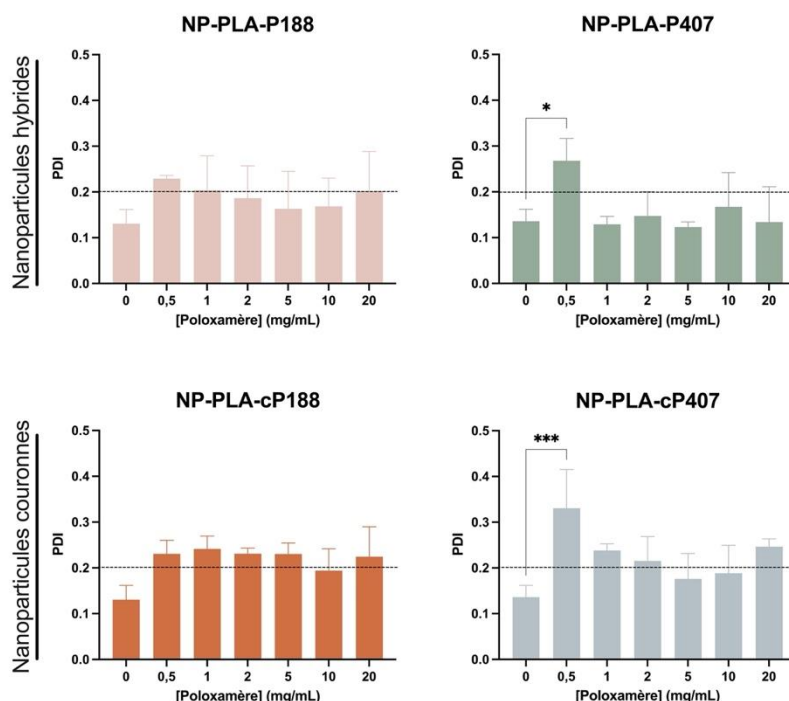


Figure 15 : Mesure du PDI des NPs contenant différentes concentrations de poloxamère P188 ou P407 ($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test ANOVA 2, précédé du test de D'Agostino-Pearson pour vérifier la normalité des données, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett, les NP-PLA sans poloxamère sont utilisées comme référence, * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$; pas de différence significative, $p > 0,05$)

Enfin, nous avons mesuré la charge des NPs (Figure 16). Dans tous les cas, nous observons une augmentation de la charge lorsque la concentration en poloxamère augmente. Ce changement nous montre que l'incorporation du poloxamère dans la synthèse a bien eu lieu. Cette modification de la charge peut s'expliquer de différentes manières. Les chaînes plus hydrophiles de POE du poloxamère peuvent se retrouver en surface des NPs et ainsi recouvrir les chaînes de PLA et modifier la mobilité électrophorétique et donc le potentiel zêta des NPs. De plus, les chaînes de PLA possèdent une fonction carboxylique chargée négativement, la présence du poloxamère peut modifier la répartition de ces groupements carboxyliques et donc masquer la charge négative et ainsi augmenter la charge de surface des NPs. Cette augmentation du potentiel zêta est plus marquée lors de l'ajout de poloxamère P407 dans la synthèse, probablement à cause de la longueur plus importante des chaînes de POE.

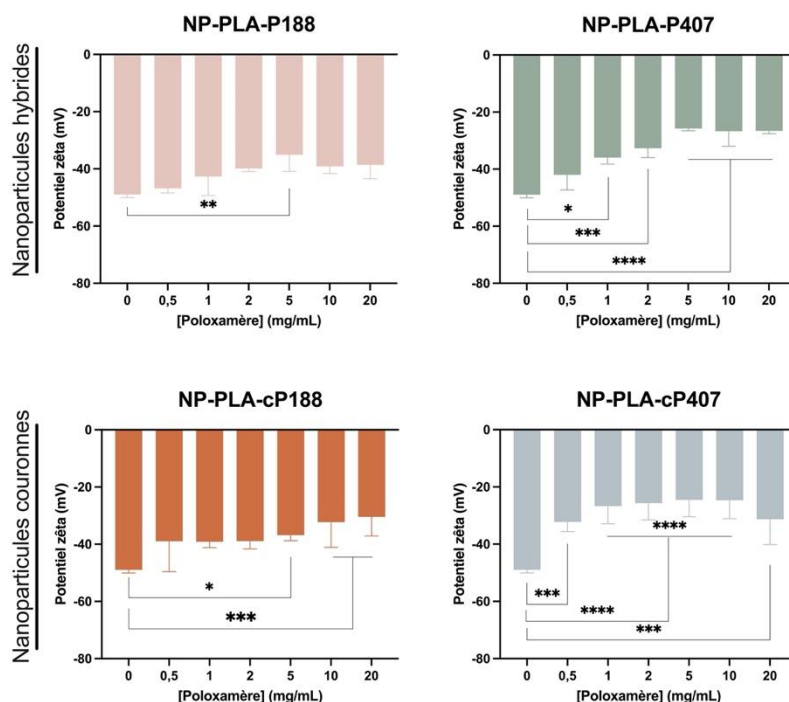


Figure 16 : Mesure de la charge des NPs contenant différentes concentrations de poloxamère P188 ou P407

($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test ANOVA 2, précédé du test de D'Agostino-Pearson pour vérifier la normalité des données, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett, les NP-PLA sans poloxamère sont utilisées comme référence, * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$; pas de différence significative, $p > 0,05$)

Cependant, si nous analysons l'ensemble des paramètres évalués ci-dessus, la condition avec 5 mg/mL de poloxamère semble la plus pertinente. En effet, le diamètre des NPs est le plus petit et elles sont plus homogènes. De plus, nous avons observé que les NPs avec une trop faible concentration de poloxamère n'étaient pas homogènes et avaient tendance à être plus grandes que les autres. Nous souhaitons également conserver un cœur majoritairement composé de PLA, ce qui éliminait les formulations avec 10 et 20 mg/mL de poloxamère, et une concentration en poloxamère suffisante pour garder ses propriétés de surfactants, la concentration de 5 mg/mL apparaissait donc comme la plus pertinente dans le cadre de ce projet.

Le taux de solide des NPs a également été mesuré par pesée de la masse sèche d'un volume donné de NPs et est exprimé en gramme pour 100 mL. Après mesure du taux de solide (Figure 17) pour toutes les concentrations de poloxamère, les deux poloxamères et les deux types de synthèse, nous remarquons une augmentation de ce taux de solide avec l'augmentation de la concentration en poloxamère.

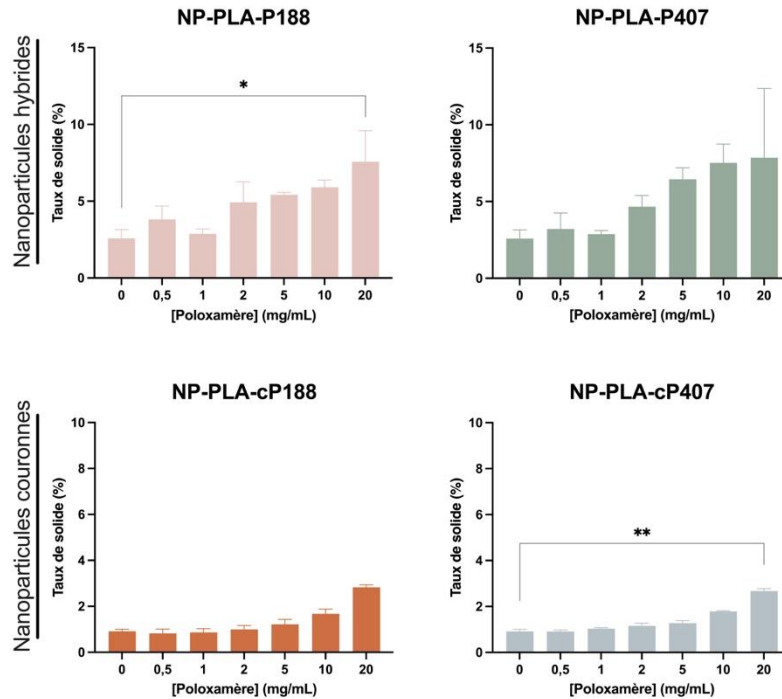


Figure 17 : Taux de solide des NPs contenant différentes concentrations de poloxamère P188 ou P407 ($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, les NP-PLA sans poloxamère sont utilisées comme référence, * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$; pas de différence significative, $p > 0,05$)

Nous avons ensuite mathématiquement relié ce taux de solide à la concentration en NPs (Figure 18). Le diamètre obtenu par DLS nous permet d'avoir le volume d'une NP. Grâce à la densité du PLA et du poloxamère, nous pouvons calculer la masse d'une NP. En divisant le taux de solide par la masse d'une NP, nous obtenons ainsi la concentration en NPs.

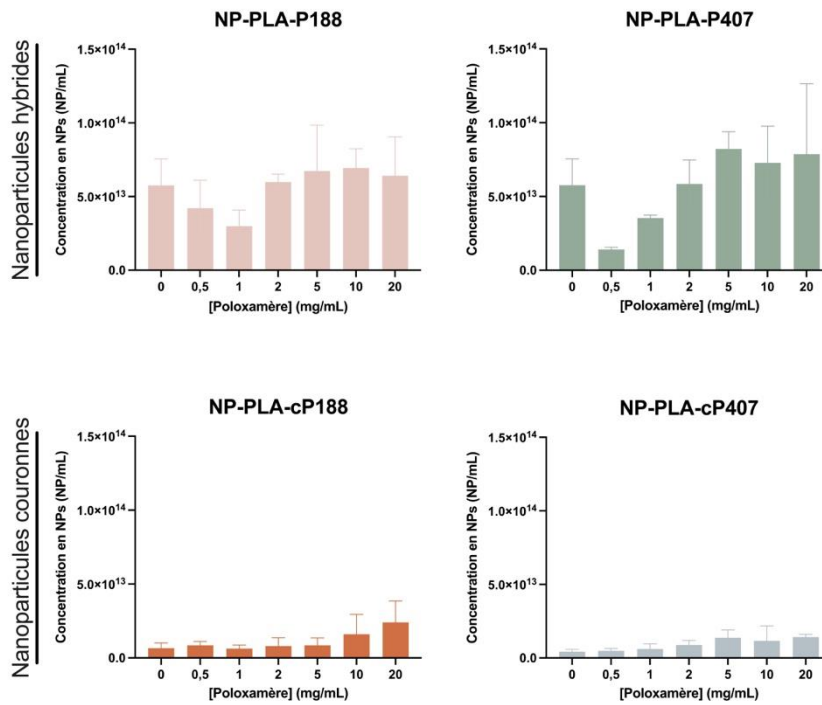


Figure 18 : Concentration des NPs en fonction du poloxamère utilisé ou du type de synthèse ($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, les NP-PLA sans poloxamère sont utilisées comme référence, pas de différence significative, $p > 0,05$)

Nous avons également mesuré cette concentration avec un appareil de mesure de la DLS qui permet de mesurer également la concentration en NPs.

En comparant les deux méthodes de mesure (Figure 19), nous observons systématiquement un facteur 10 entre la concentration mesurée par pesée et celle mesurée par DLS. Cette différence peut s'expliquer notamment par le mode de calcul de la DLS, qui détermine le diamètre hydrodynamique des NPs, prenant en compte les molécules d'eau présentes à la surface des NPs. De plus, lors de la mesure de la concentration par DLS, l'appareil utilise plusieurs angles différents pour le laser, ce qui n'est pas le cas lors de notre détermination du diamètre qui ne se fait qu'à un seul angle. Ces différents facteurs peuvent expliquer la différence entre la concentration mesurée par pesée ou par DLS.

Cette information sera prise en compte pour l'ajout de NPs sur les cellules. Quelle que soit la méthode de détermination, cette concentration n'est pas significativement différente lorsque la concentration en poloxamère augmente. Cela nous confirme que l'augmentation de masse des NPs dans un volume fixe n'est pas liée à une augmentation de la concentration de NPs mais est liée à l'augmentation de la masse d'une NP. Cela confirme donc l'incorporation des poloxamères dans les NPs.

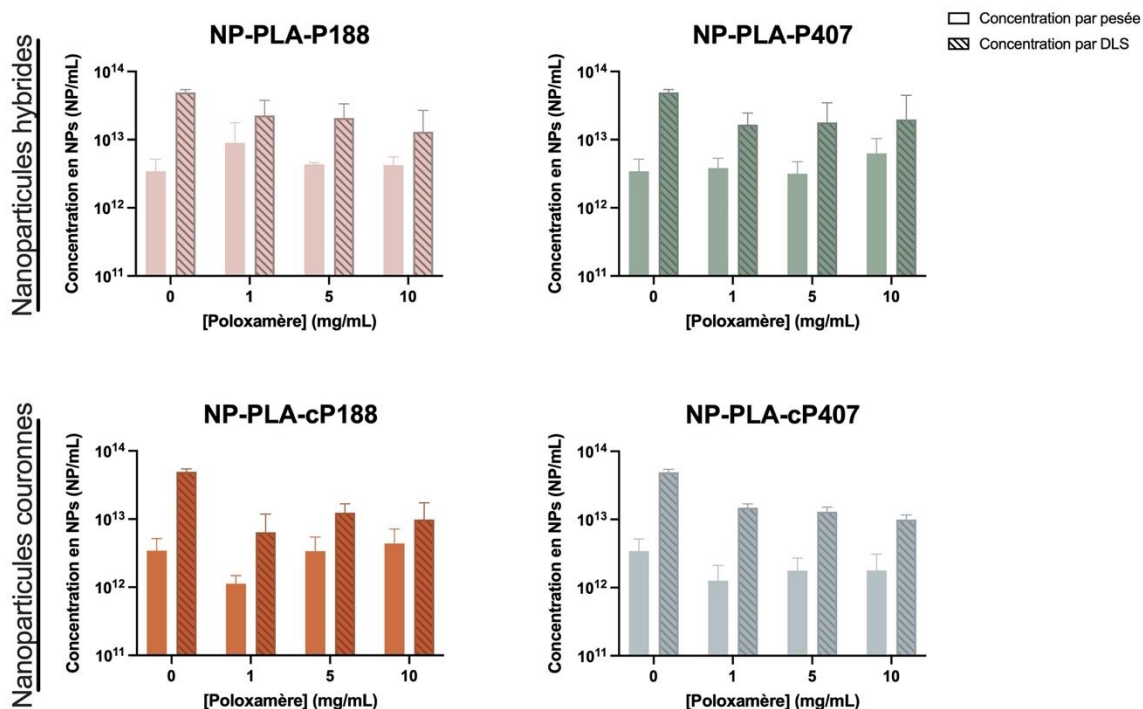


Figure 19 : Comparaison des méthodes de mesure de la concentration des NPs, la concentration a été mesurée par pesée grâce au taux de solide ou bien par diffusion dynamique de la lumière ($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type)

En plus de la mesure de DLS, de la charge et du taux de solide, nous avons souhaité évaluer la proportion de poloxamère restant dans le surnageant des NPs. En effet, nous pensions que lors de l'augmentation de la quantité de poloxamère dans la synthèse des NPs, un plateau était atteint, montrant qu'au-delà d'une certaine quantité de poloxamère, ce dernier était en excès et restait dans le surnageant des NPs.

Pour cela, nous avons centrifugé les NPs afin qu'elles se retrouvent dans le culot, puis nous avons réalisé une mesure du taux de solide dans ce surnageant, afin d'avoir potentiellement la masse de poloxamère non incorporé dans la NP. Ce taux de solide dans le surnageant a été exprimé comme proportion du taux de solide total. Comme montré dans la Figure 20, plus la concentration de poloxamère dans la synthèse est importante, plus il en reste dans le surnageant des NPs. Nous remarquons également que, comme attendu, la proportion de poloxamère dans le surnageant augmente jusqu'à atteindre un plateau, ce dernier étant atteint lorsque la concentration en poloxamère dépasse les 10 mg/mL. Cette concentration ne doit donc pas être dépassée pour limiter la quantité de poloxamère dans le surnageant des NPs et le risque de formation de micelles de poloxamères.

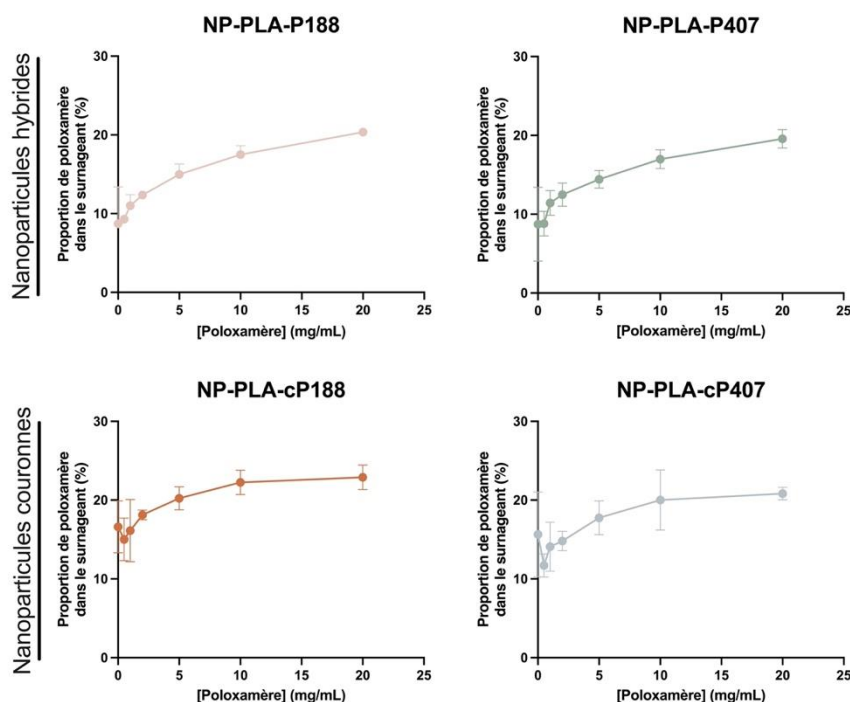


Figure 20 : Évaluation du taux de solide dans le surnageant des NPs
($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type)

L'ensemble de ces résultats semble confirmer la pertinence des synthèses avec 5 mg/mL de poloxamère pour notre projet.

Enfin, avant usage dans des milieux biologiques, sur des cellules ou chez des êtres vivants, nos préparations doivent respecter au maximum les recommandations de la Pharmacopée Européenne, qui mentionnent que « les préparations nasales sont non-irritantes et n'exercent aucun effet notable sur les fonctions de la muqueuse nasale et les cils ». Cela implique que les préparations soient isotoniques ou *a minima* hypertonique et que leur pH soit compris entre 6,5 et 8 (258). Cependant, nos NPs sont synthétisées dans du tampon carbonate de sodium 5 mM. Ce tampon a un pH autour de 10,5 et est hypotonique. Il est donc nécessaire de changer le milieu dans lequel se trouve les NPs pour se placer dans de l'eau qui est plus proche des prérequis de la Pharmacopée Européenne, bien qu'elle soit hypotonique, et qui est plus pertinente pour d'autres applications développées dans le chapitre 3.

Ce transfert dans l'eau s'est fait, dans un premier temps par dialyse. La dialyse étant très chronophage, nous avons également essayé de centrifuger nos NPs pour les suspendre dans de l'eau. Les caractéristiques des NPs après dialyse ou après centrifugation et suspension en eau sont montrés dans la Figure 21. Ainsi aucune différence significative n'a été montrée, ni pour la dialyse, ni pour la centrifugation, la centrifugation-suspension en eau, plus rapide, a été validée pour la suite des expériences.

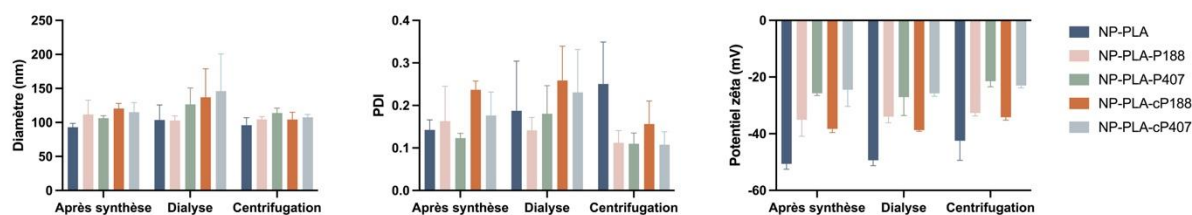


Figure 21 : Caractérisation des NPs après dialyse en eau ou centrifugation-suspension en eau ($n=2$ pour les couronnes dialysées, sinon $n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, $ns : p > 0,05$)

Ces résultats nous permettent de confirmer que nos formulations pouvaient remplir les critères de la Pharmacopée Européenne pour les préparations nasales et donc étaient potentiellement utilisables comme véhicule de médicaments pour traiter les pathologies cérébrales.

L'ensemble de ces résultats nous montre que nous avons obtenu des NP-PLA de taille inférieure à 100 nm, homogènes et chargées négativement. Nous avons pu incorporer différentes concentrations de poloxamère dans ces NPs, de deux manières différentes. Cette incorporation a été visualisée par une modification de la charge de surface des NPs et par une augmentation du taux de solide, sans augmentation de la concentration en NPs. Nous avons enfin pu comparer les différentes concentrations de poloxamères et nous avons pu fixer la concentration 5 mg/mL comme étant la plus pertinente pour la suite du projet. Nous avons pu enfin démontrer que cette formulation pouvait parfaitement correspondre aux critères de la Pharmacopée Européenne et donc remplir les critères physiques, biologiques et réglementaires pour être utilisé pour la délivrance de médicament du nez au cerveau.

II. Caractérisations physicochimiques

A. Stabilité des nanoparticules

1. Des nanoparticules stables dans le temps

Les mesures de DLS ont été répétées toutes les semaines pendant plus d'un mois afin de vérifier la stabilité de conservation des NP-PLA (Figure 22). Ces mesures n'ont pas montré de variations importantes du diamètre. Il est à noter qu'aucune différence significative d'homogénéité ou de charge n'a été observée non plus. Les NPs de PLA sont donc stables lorsqu'elles sont conservées à 4°C pendant au moins 38 jours.

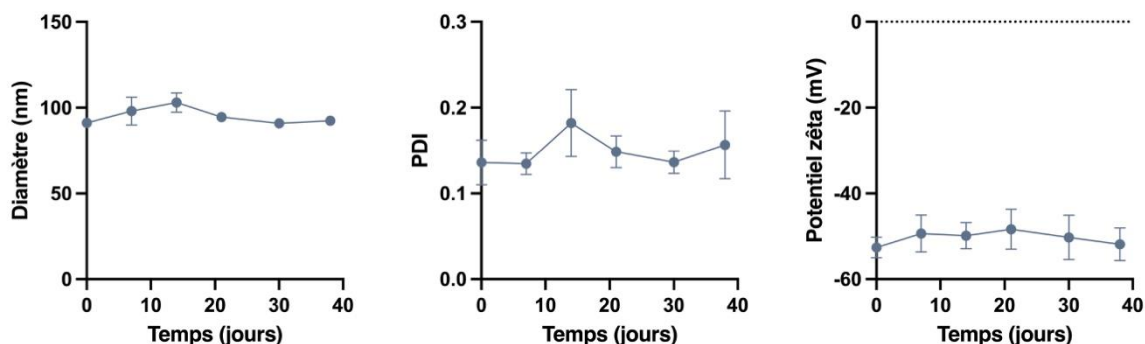


Figure 22 : Stabilité du diamètre, du PDI et de la charge des NP-PLA au cours du temps lorsqu'elles sont conservées à 4°C

($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, pas de différence significative par rapport au temps 0, $p > 0,05$)

De la même manière que pour les synthèses de NP-PLA, la stabilité des NPs contenant du poloxamère (5 mg/mL) a été évaluée pendant 35 jours (Figure 23). Toutes les formulations contenant du poloxamère restent stables pendant au moins 35 jours.

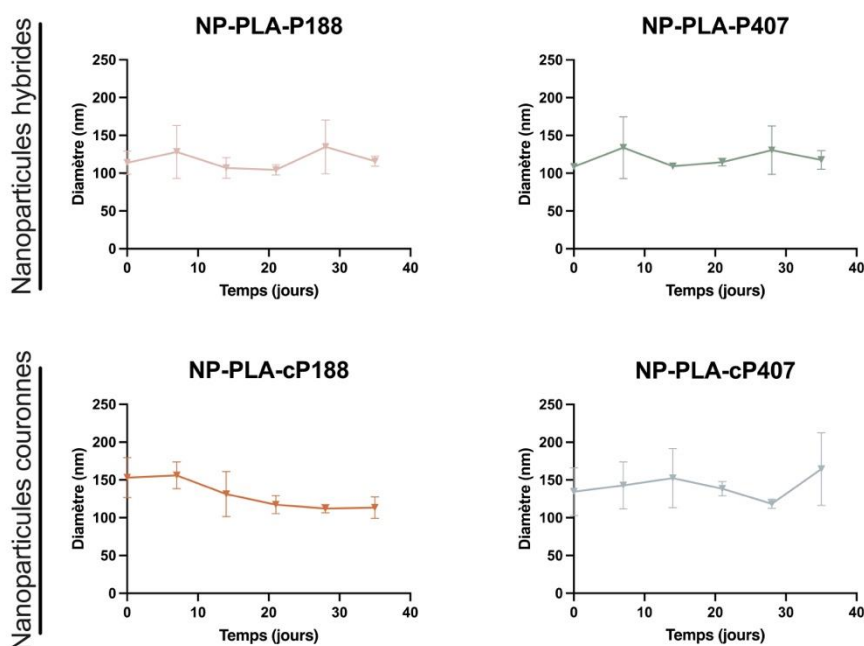


Figure 23 : Stabilité des NPs contenant du poloxamère au cours du temps

($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, pas de différence significative, $p > 0,05$)

L'ensemble de ces résultats nous montre que nous avons obtenu des NPs stables lors de leur conservation à 4°C, pour toutes les formulations avec et sans poloxamère, quel que soit le type de synthèse ou le type de poloxamère.

2. Des nanoparticules stables dans les milieux biologiques

Nous avons ensuite souhaité vérifier la stabilité des NPs dans différents milieux biologiques qu'elles peuvent rencontrer lors de l'ANC. Nous avons donc choisi d'étudier nos formulations avec 5 mg/mL de poloxamère, resuspendues dans l'eau, dans du mucus artificiel et du liquide céphalo-rachidien (LCR) artificiel.

Le mucus artificiel est composé de 8 % de mucine de type II d'estomac de porc ainsi que de différents sels, le pH est ajusté à 5,7 (233). Le LCR artificiel est, quant à lui, composé également de sels, de glucose, d'acide ascorbique et d'albumine de sérum bovin (BSA). Son pH est de 7,35 (220).

Les NPs sont diluées dans le mucus artificiel à 37°C et des mesures de leur diamètre, homogénéité et charge sont faites à différents temps (Figure 24). Nous avons observé une très forte augmentation du diamètre des NP-PLA, en particulier au moment de la dilution allant jusqu'à 2000 nm. Puis, bien que le diamètre diminue au cours du temps, il reste néanmoins au-dessus de 610 nm 24 h après la dilution. Ceci suggère une instabilité colloïdale des NP-PLA dans le mucus artificiel. Les NPs contenant du poloxamère ne voit pas leur diamètre modifié, ce dernier restant autour de 131 nm. L'homogénéité des NPs est impactée immédiatement après la dilution, pour les NP-PLA, les NP-PLA-cP188 et les NP-PLA-cP407 avec un PDI qui dépasse 0,6 pour les NP-PLA et 0,25 pour les NP-PLA avec une couronne de poloxamère. Cette homogénéité est stabilisée 6 h après la dilution, le PDI revenant autour de 0,2. Cependant, le PDI des NP-PLA reste tout de même assez élevé, proche de 0,5 ce qui n'est pas observé pour les autres formulations comprenant des poloxamères. De la même manière la charge est fortement modifiée au moment de la dilution pour toutes les formulations, ce qui est cohérent avec le changement de pH et la présence de sels.

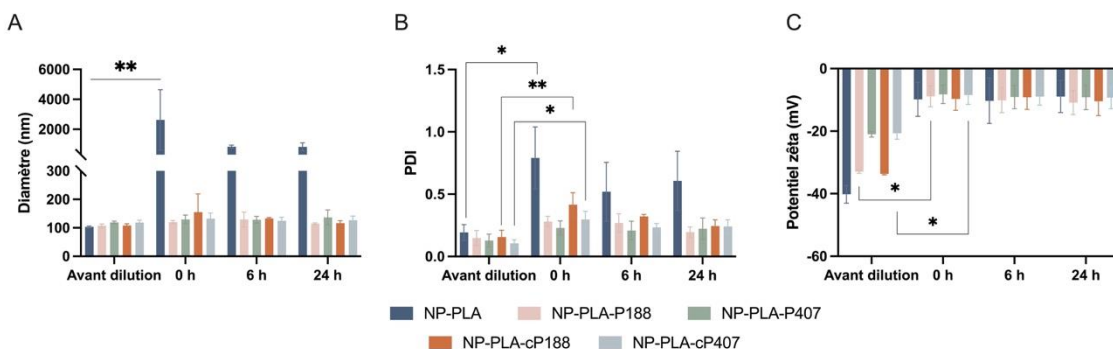


Figure 24 : Stabilité du diamètre (A), de l'homogénéité (B) et de la charge (C) des NPs après dilution dans du mucus artificiel

(n=3, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, **: $p < 0,005$; * : $p < 0,05$ et ns : $p > 0,05$)

Comme précédemment, les NPs sont diluées dans le LCR artificiel à 37°C et leurs caractéristiques sont évaluées au cours du temps (Figure 25). Au moment de la dilution, aucune modification significative ni du diamètre ni de l'homogénéité des formulations n'a été identifiée. Au-delà de 6 h après la dilution, les NP-PLA augmentent fortement de diamètre et deviennent moins homogènes, ce qui n'est pas le cas des NPs contenant du poloxamère. La charge, quant à elle, reste stable après la dilution dans le LCR quelle que soit la formulation.

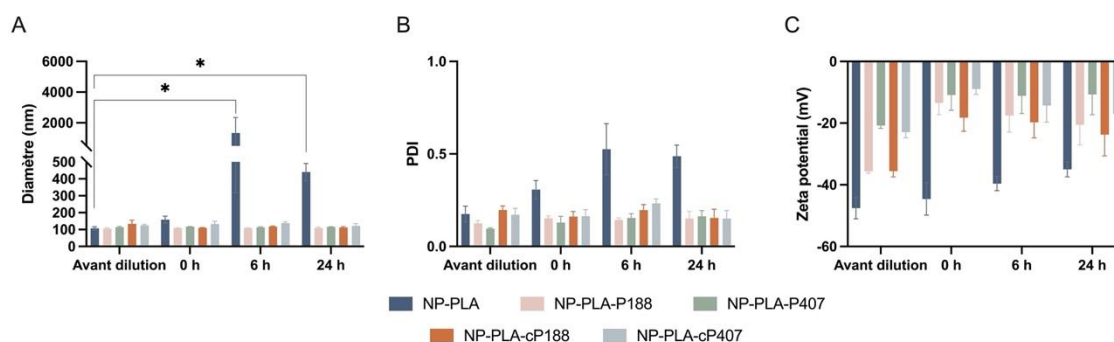


Figure 25 : Stabilité du diamètre (A), de l'homogénéité (B) et de la charge (C) des NPs après dilution dans du LCR artificiel

(n=3, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, * : $p < 0,05$ et ns : $p > 0,05$)

L'ensemble de ces résultats nous montre que les NPs contenant du poloxamère sont plus stables d'un point de vue des caractéristiques physicochimiques dans les milieux biologiques que les NP-PLA. Cela confirme également la capacité des poloxamères à stabiliser les NPs.

L'ensemble de ces résultats ne nous ont pas permis d'établir de différence entre les deux poloxamères, ni entre les deux types de synthèse.

B. Modélisation moléculaire des assemblages polymériques

Afin de modéliser les interactions entre le PLA et le poloxamère et la formation des quatre types de NPs (couronnes et hybrides, P188 et P407), nous avons collaboré avec une autre équipe du laboratoire, le Dr Simon Megy de l'équipe du Pr. Raphaël Terreur.

Cette modélisation a été réalisée à l'aide de la technique de dynamique des particules dissipatives (DPD). Cette dernière modélise des groupes d'atomes en billes par une approche à gros grain, chaque bille pouvant avoir des paramètres de charge et de solubilité différents. Dans notre cas, nos modèles seront réduits au 1/5^{ème}. Une bille d'eau représentera trois molécules d'eau. Les molécules de PLA seront construites avec des billes centrales représentant les monomères d'acide lactique, puis deux billes aux extrémités pour les fonctions hydroxyle et carboxyle de chacune des extrémités. Pour les molécules de

poloxamères, nous avons procédé de la même manière avec des billes centrales pour les monomères d'oxyde de propylène ou d'oxyde de polyéthylène, puis une bille pour chaque extrémité pour les fonctions hydroxyle. Le nombre de billes varie en fonction du poloxamère pour garder la bonne proportion de chaque monomère dans le P188 et dans le P407. L'ensemble des billes utilisées ainsi que les molécules utilisées comme base pour la simulation sont représentés dans la Figure 26.

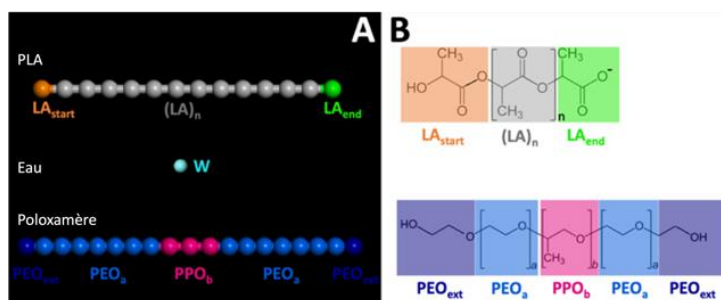


Figure 26 : Représentation schématique des différentes billes utilisées pour les calculs de DPD (A) en se basant sur les formules chimiques des molécules (B)

Afin de modéliser les deux types de synthèse, nous avons utilisé deux points de départ différents. Pour les synthèses des NPs hybrides, nous sommes partis d'un stade où les deux molécules, le PLA et le poloxamère, sont dissoutes dans le milieu aqueux de manière totalement désordonnée. Dans le cas des NPs couronnes, nous partons d'une configuration où les molécules de PLA sont réunies au centre afin de modéliser une NP de PLA préformée et les molécules de poloxamère sont à la surface de la NP de PLA préformée. Les simulations sont ensuite lancées et un équilibre a été atteint dès les premières nanosecondes de simulation. Les points de départ, ainsi que les points finaux en coupe, ainsi que la surface des NPs finales sont représentés dans la Figure 27.

Pour les NPs hybrides, les chaînes de PLA et de poloxamères se contractent et les molécules d'eau sont expulsées vers l'extérieur. L'intérieur de la NP est assez hydrophobe et contient beaucoup de monomère d'acide lactique (en gris), de POE (en bleu clair) et de POP (en rose). La plupart des extrémités hydroxyle et carboxyle chargées négativement des chaînes de PLA (en orange et vert, respectivement) sont concentrées à la surface des NPs en interaction directe avec le milieu aqueux environnant. Pour les chaînes de poloxamères, les POE (en bleu), qui sont légèrement plus hydrophiles que les POP (en rose), sont de loin plus présents à la surface, tandis que les POP sont plus profondément enfouis à l'intérieur des NPs et que très peu d'entre eux sont visibles à la surface. Ceci est particulièrement pertinent pour le P188, dont les chaînes plus courtes de POP hydrophobes sont plus profondément enfouies que celles du P407 plus longues. Dans les deux cas, les extrémités hydrophiles des chaînes de poloxamères (en bleu foncé) se retrouvent également très concentrées à la surface des NPs.

Pour les NPs couronnes, la contraction de chaînes n'est pas observée, la NP-PLA étant déjà formée. Dès le début de la simulation, les chaînes des deux polymères se mélangent donnant des résultats très proches des NPs hybrides. Ces simulations des NPs couronnes met en évidence la grande compatibilité des deux polymères dont les chaînes se retrouvent particulièrement imbriquées à la fin de la simulation.

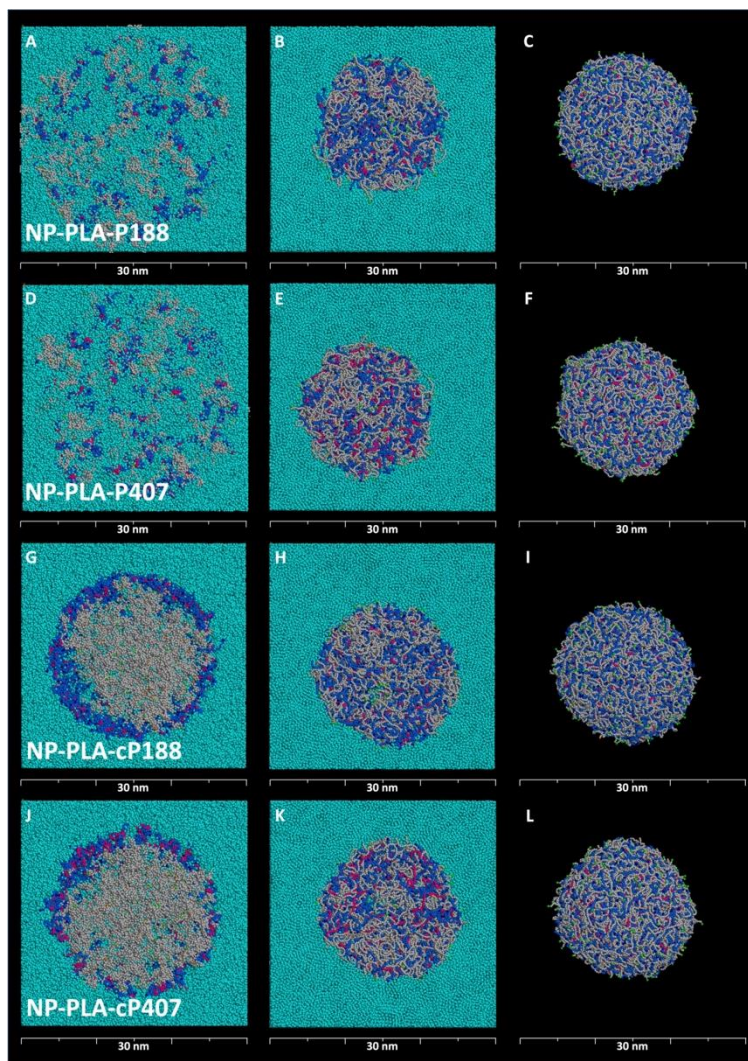


Figure 27 : Représentation des NPs formées grâce à la méthode de DPD. Les points de départ sont différents entre les deux types de synthèse sont représentés en coupe axiale (A, B, C, D), les NPs sont formées et après 30 nanosecondes, nous observons une coupe axiale (E, F, G, H) et la surface des NPs (I, J, K, L).

En analysant les résultats de diamètre et de charge, les résultats des simulations par DPD sont très cohérents avec nos résultats de caractérisation qui montraient des NPs de 110 nm (environ 20 nm dans nos simulations) et chargées négativement. Nous pouvons donc penser que, comme le confirme les simulations, les NPs hybrides et les NPs couronnes, sont extrêmement similaires, voire même identiques.

III. Évaluation *in vitro*

Une fois les synthèses optimisées pour l'ANC, il est nécessaire de tester leur impact sur les cellules.

A. Différents types cellulaires

Pour cela, nous avons choisi deux types cellulaires différents : les RPMI 2650 et les PC12. En effet, comme expliqué dans le chapitre 1, la muqueuse olfactive, que nous souhaitons atteindre avec nos formulations, est composée principalement de cellules épithéliales et de cellules neuronales. Les RPMI 2650 mimeront les cellules épithéliales nasales et les PC12 seront utilisées comme modèle de cellules neuronales.

Les RPMI 2650 sont des cellules immortalisées provenant d'un carcinome du septum nasal humain (259). Ces cellules sont particulièrement utilisées pour évaluer les formulations pour la voie nasale tant au niveau de la toxicité que de la perméabilité (260,261). Les cellules RPMI 2650 sont cultivées dans un milieu de culture supplémenté en sérum et antibiotiques, et elles sont passées régulièrement.

Les PC12 sont des cellules de phéochromocytome de rat et sont très utilisées en neurobiologie. En culture, ce sont des cellules des glandes surrénales, mais lorsqu'on ajoute du facteur de croissance neuronale (NGF) dans le milieu de culture, les PC12 sont capables de se différencier en neurones ganglionnaires sympathiques, à la fois morphologiquement et fonctionnellement. Les PC12 différenciées sont capables de synthétiser et de stocker la dopamine et constituent un modèle particulièrement approprié pour l'étude de la neurotoxicité (262). Les cellules PC12 sont différenciées dans des plaques de culture cellulaire recouvertes de collagènes de type I, grâce à du milieu de culture supplémenté en NGF pendant 7 jours. La différenciation est vérifiée au microscope grâce à la présence de prolongement dendritiques autour des cellules (Figure 28).

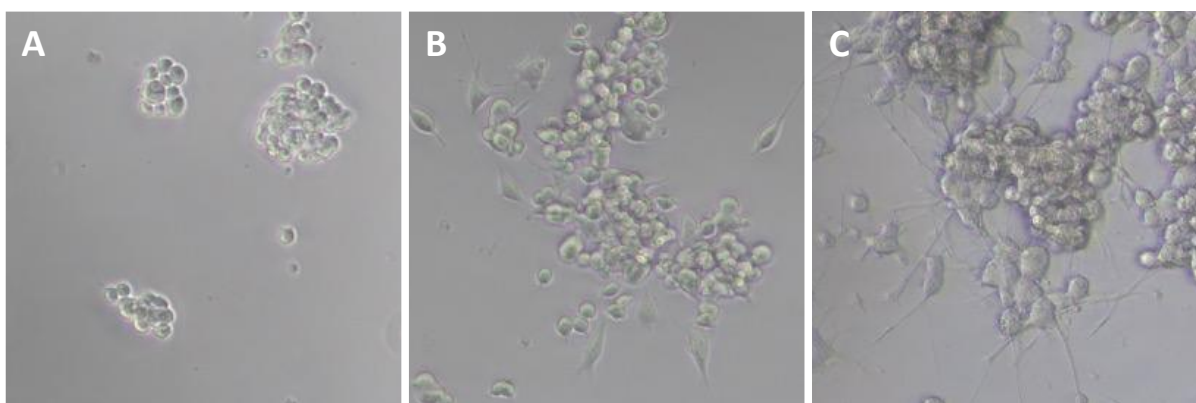


Figure 28 : Différenciation des cellules PC12 observées au microscope optique (A : J0, B : J2 et C : J6)

Afin d'obtenir un modèle plus pertinent, nous avons réalisé des cultures à l'interface air-liquide (ALI). En effet, il a déjà été montré que les RPMI 2650 cultivées en ALI étaient capables de former un épithélium nasal avec notamment des jonctions serrées (JS) et une perméabilité conservée, par comparaison avec l'épithélium excisé. Bai *et al.* ont d'ailleurs mentionné que les RPMI 2650 formaient une monocouche de cellules, très similaire à l'épithélium de la cavité nasale (158). D'autres équipes, notamment Silva *et al.*, mentionnent l'expression de mucines dans les cultures ALI des RPMI 2650 (156). Même si ce modèle ne présente pas des cellules ciliées, ces cellules cultivées en ALI pourraient reproduire de manière plus adaptée l'administration de médicaments par voie nasale et donc de caractériser l'impact des formulations sur la muqueuse nasale (156).

Pour la culture en ALI, les cellules sontensemencées dans des inserts de culture. Du milieu de culture est placé sous l'insert et dans l'insert. Puis une fois la confluence atteinte, le milieu apical est enlevé et les cellules sont donc exposées à l'air libre. Nous avons récupéré les cultures à différents temps après le passage à l'ALI. Ces cultures ont été coupées au cryostat et après marquage par immunofluorescence des protéines de jonctions (E-cadhérine ou ZO1, en vert), des noyaux (en bleu) et de la mucine 5AC (en rouge), nous avons pu mesurer l'épaisseur des cultures au cours du temps (Figure 29). Nous avons pu observer dans un premier temps que 10 jours après le passage à l'ALI, nos cultures sont déjà composées de plusieurs couches de cellules exprimant les protéines des JS ZO1 et E-cadhérine. L'épaisseur des cultures augmente au cours du temps et l'expression des JS est présente aux différents temps étudiés. Enfin, à des temps courts comme à des temps longs, nous n'avons pas observé de production de la mucine 5AC dans nos cultures.

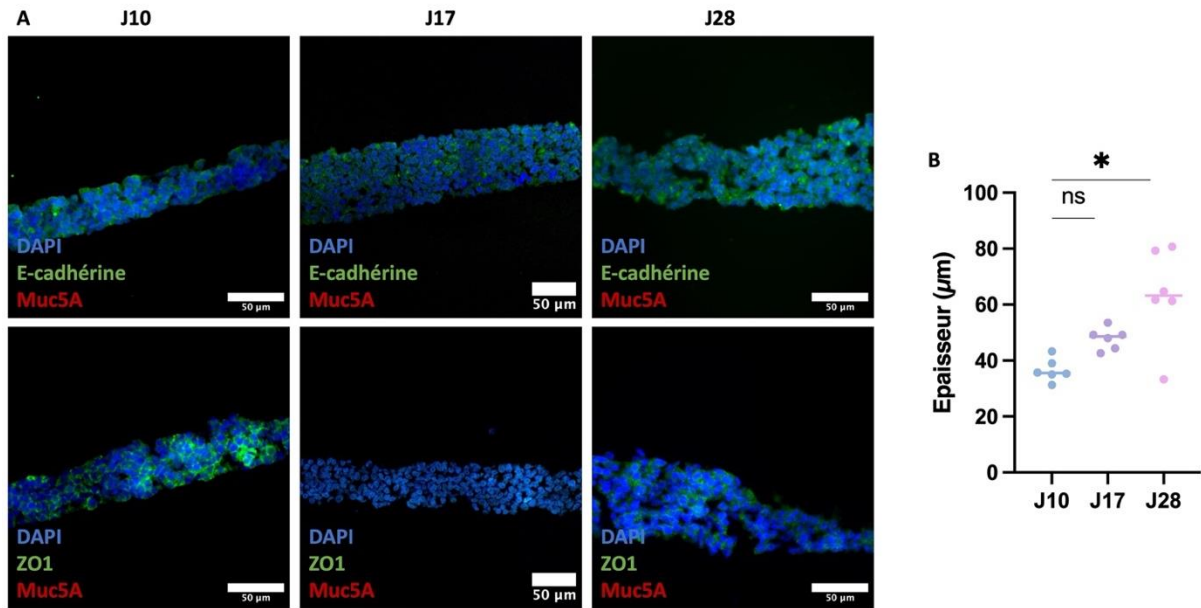


Figure 29 : Culture ALI des RPMI 2650. Images au microscope suite à un marquage par immunofluorescence des cultures de RPMI 2650 à l'interface air-liquide (A). Les noyaux sont marqués avec le DAPI (bleu), les protéines des JS sont marquées avec un anticorps anti-ZO1 ou anti-E-cadhérine (en vert) et la mucine est marquée avec un anticorps anti-Muc5AC (en rouge). En utilisant Fiji, l'épaisseur des cultures est mesurée à plusieurs endroits différents (B) (n=1, les résultats du graphique sont présentés avec la médiane)

Ce modèle reste donc très différent de la muqueuse olfactive *in vivo*, à cause notamment de la présence de plusieurs couches de cellules et l'absence de production de la mucine 5AC. Ces différences, probablement dues à l'hétérogénéité des protocoles développés pour la culture ALI, ainsi que le temps de culture (d'environ 30 jours) ne nous ont pas permis de poursuivre avec ce modèle en 3D, dont la plus-value par rapport à une culture en 2D est limitée.

B. Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée sur ces deux types cellulaires grâce à la méthode du PrestoBlue. Ce test est basé sur l'utilisation de la résazurine comme marqueur de la viabilité cellulaire. Ce composé, ajouté au milieu de culture, est non fluorescent et va être réduit lors de la respiration mitochondriale des cellules. Grâce à la captation d'électrons provenant de différentes molécules du métabolisme. La résazurine est alors réduite en résorufine, un composé fluorescent. La réduction de la résazurine est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et métaboliquement actives. En comparaison avec d'autres tests comme le MTT, le test PrestoBlue est plus rapide et beaucoup plus sensible (263).

Nous avons dans un premier temps évalué la viabilité des RPMI 2650 en faisant varier la concentration en poloxamère, pour les deux poloxamères et pour les deux types de synthèse. Après culture des cellules et mise en contact avec les différentes formulations

pendant 24 h, le test PrestoBlue est réalisé pour évaluer la viabilité des cellules en présence de 10^5 NPs par cellule. La viabilité résulte de la comparaison entre la fluorescence des cellules en contact avec la formulation par rapport à la fluorescence des cellules non traitées. Comme montré dans la Figure 30, aucune formulation n'est toxique pour les cellules, cela confirme une fois de plus que nous pouvons nous concentrer sur les formulations avec 5 mg/mL de poloxamère, la concentration de ce polymère n'ayant pas d'influence sur la viabilité des cellules RPMI 2650.

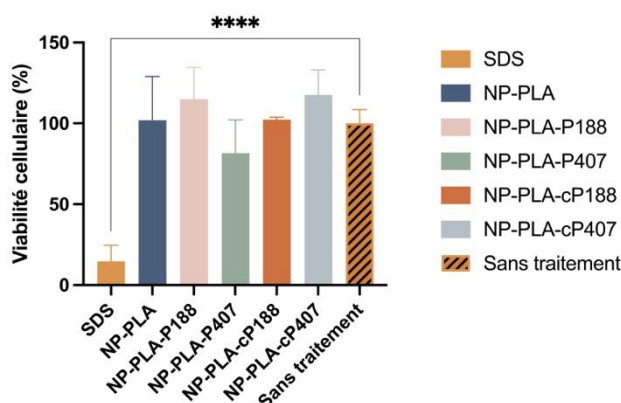


Figure 30 : Viabilité des cellules RPMI 2650 après 24 h d'incubation avec les différentes NPs ($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test Anova suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett, la normalité des données a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk, **** : $p < 0,0001$; ns : $p > 0,05$)

Les cellules PC12 ont été différenciées et sont ensuite mises au contact des différentes formulations pendant 24 h et le test PrestoBlue est ensuite réalisé. La viabilité cellulaire est déterminée comme précédemment. Ainsi, comme nous pouvons le voir sur la Figure 31, les cellules sont viables quelle que soit la formulation.

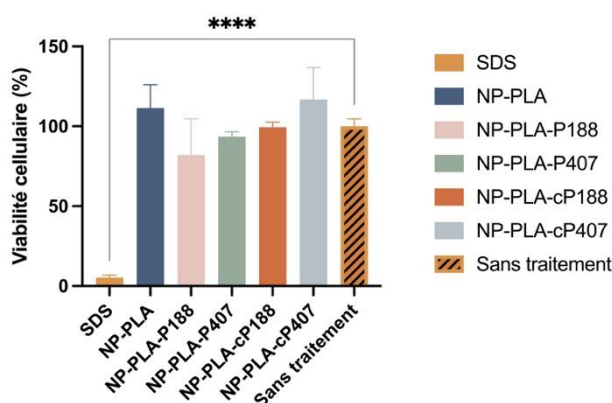


Figure 31 : Viabilité des cellules PC12 différenciées après 24 h d'incubation avec les différentes NPs ($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test Anova suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett, la normalité des données a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk, **** : $p < 0,0001$ et ns : $p > 0,05$)

Dans le cadre de ce projet, nous avons donc des formulations adaptées à l'ANC avec un risque limité de toxicité au niveau de la muqueuse nasale et des cellules nerveuses.

C. Internalisation par les cellules de la muqueuse nasale

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'internalisation des NPs dans les différents types cellulaires. Nous avons voulu comparer les différentes formulations mais également vérifier s'il existait une internalisation préférentielle entre l'un ou l'autre des deux types cellulaires.

Cette internalisation est souvent observée en utilisant la cytométrie en flux ou bien la microscopie (70,151). Nous avons donc testé ces deux techniques. Pour cela, nous avons dans un premier temps synthétisé des NPs fluorescentes encapsulant le fluorochrome DY650 (λ_{ex} : 653 nm et λ_{em} : 674 nm). L'internalisation des NPs fluorescentes a été visualisée 1 h ou 3 h après mise en contact des NPs avec les cellules, à 37°C et à 4°C (comme contrôle négatif).

Tout d'abord, nous avons voulu évaluer l'internalisation des NPs fluorescentes en cytométrie en flux. Cette technique nous permet de visualiser les cellules une par une et de déterminer si elles fluorescent, donc si elles ont internalisé des NPs. Pour cela, les cellules ont été cultivées en plaque 96 puits, puis les NPs fluorescentes (DY650) ont été déposées sur les cellules RPMI 2650 et incubées pendant 1 h ou 3 h. Puis les cellules sont récupérées et passées en cytométrie en flux. Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel OMICS (Dotmatics, Etats-Unis). Les cellules seules ont été isolées puis nous avons sélectionné les cellules fluorescentes, qui avaient donc internalisé les NPs (Figure 32A). Nous avons exprimé les données en pourcentage de cellules seules fluorescentes par rapport au nombre total de cellules seules (Figure 32B). Le pourcentage d'internalisation est très faible. Après 1 h de contact, ce pourcentage est inférieur à 2 % pour toutes les formulations. Nous pouvons remarquer cependant que cette internalisation augmente avec le temps, à 3 h, elle est plus importante qu'après 1 h d'incubation entre les NPs et les RPMI 2650.

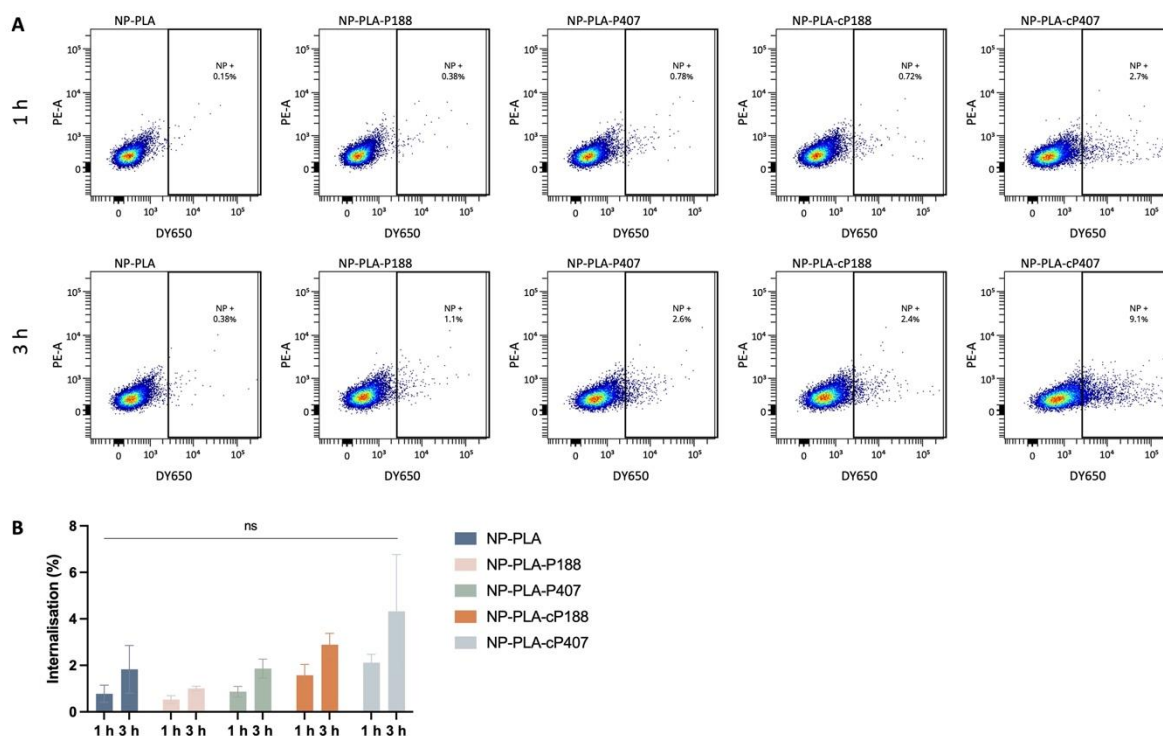


Figure 32 : Évaluation par la cytométrie en flux de l'internalisation des NPs fluorescentes par les RPMI 2650 après 1 h ou 3 h d'incubation.

Les cellules seules ont été isolées puis les cellules qui contiennent des NPs fluorescentes sont également isolées (A). L'internalisation est évaluée par le pourcentage de cellules seules fluorescentes par rapport aux cellules seules totales ($n=3$, les données sont présentées comme moyenne $\pm$ erreur type de la moyenne, les formulations ont été comparées par le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, les temps ont été comparés avec le test de Mann-Whitney, $ns : p > 0,05$)

Nous avons procédé de la même manière pour visualiser l'internalisation des NPs fluorescentes (DY650) dans les PC12 différenciées. Ces résultats (Figure 33) nous montrent dans un premier temps que les PC12 différenciées sont capables d'internaliser les NPs fluorescentes. Avec le temps, nous observons une plus grande internalisation pour toutes les formulations. Aucune différence significative entre les différentes formulations n'a été démontrée. Enfin, l'internalisation des NPs fluorescentes par les PC12 différenciées est sensiblement plus importante que dans les RPMI 2650.

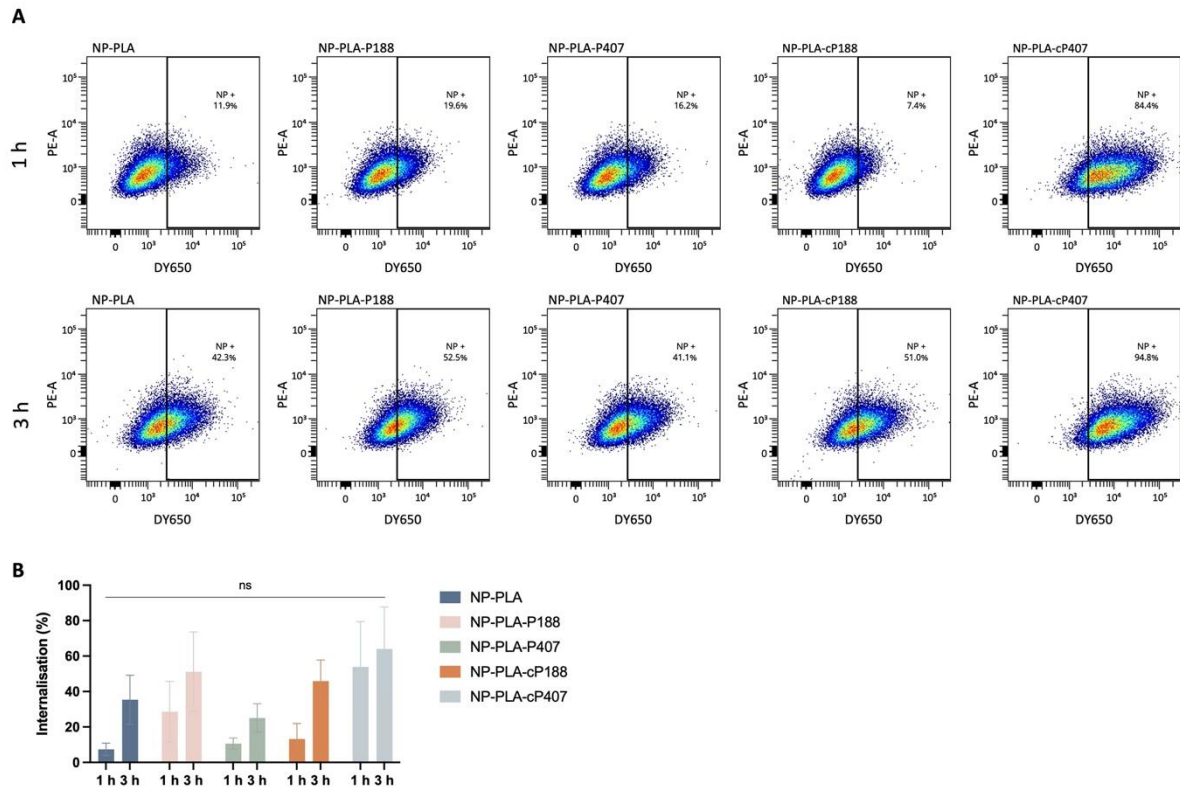


Figure 33 : Évaluation par cytométrie en flux de l'internalisation des NPs fluorescentes par les PC12 différenciées après 1 h ou 3 h d'incubation.

Les cellules seules ont été isolées puis les cellules qui contiennent des NPs fluorescentes sont également isolées (A). L'internalisation est évaluée par le pourcentage de cellules seules fluorescentes par rapport aux cellules seules totales ($n=3$, les données sont présentées comme moyenne $\pm$ erreur type de la moyenne, les formulations ont été comparées avec le test ANOVA 2, précédé des tests de normalité d'Anderson-Darling, suivi du test de comparaisons multiples de Sidak, les temps ont été comparés avec le test de Mann-Whitney ns : $p > 0,05$)

Enfin, nous avons essayé de visualiser cette internalisation en microscopie. Pour cela, nous avons de la même manière cultivé les cellules, déposé les NPs fluorescentes sur les cellules puis nous avons fixé les cellules. Nous avons ensuite réalisé un marquage au DAPI qui met en avant les noyaux et à la phalloïdine fluorescente qui se fixe sur les filaments d'actine du cytosquelette. Cela nous permet donc de visualiser dans un premier temps les RPMI 2650 et les NPs grâce à un microscope confocal à fluorescence (Figure 34). Malgré l'utilisation de NPs fluorescentes, nous n'avons pas pu observer de NPs dans les cellules après 1 h ou 3 h d'incubation.

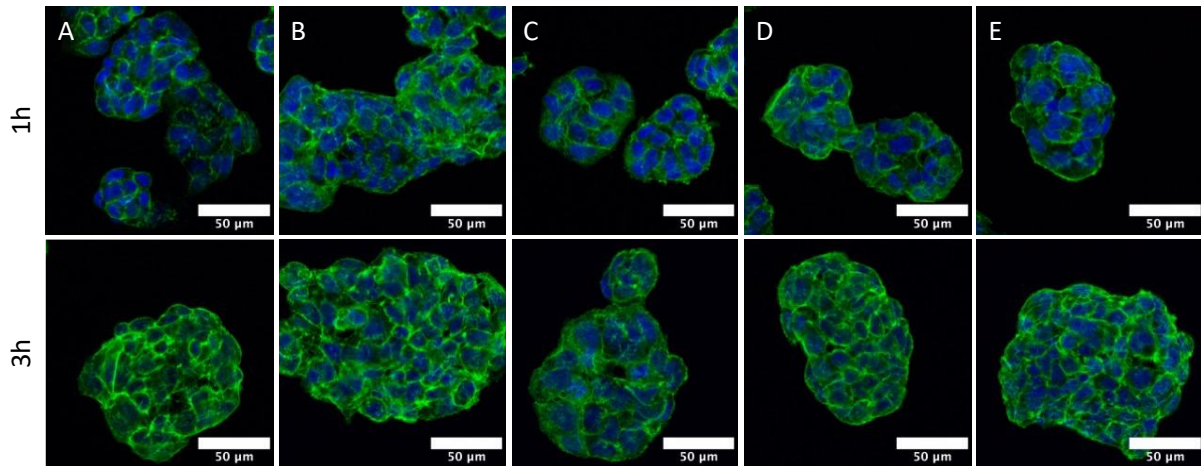


Figure 34 : Évaluation en microscopie à fluorescence de l'internalisation des NPs fluorescentes par les RPMI 2650 après 1 h ou 3 h de contact avec les NP-PLA (A), les NP-PLA-P188 (B), les NP-PLA-P407 (C), les NP-PLA-cP188 (D) ou les NP-PLA-cP407 (E).

Le noyau des cellules est marqué avec le DAPI (bleu), le cytosquelette est marqué avec la phalloïdine (vert) et les NPs apparaissent en rouge (n=1)

Des observations similaires ont été faites suite à l'incubation des NPs fluorescentes et des cellules PC12 différenciées pendant 7 jours (Figure 35).

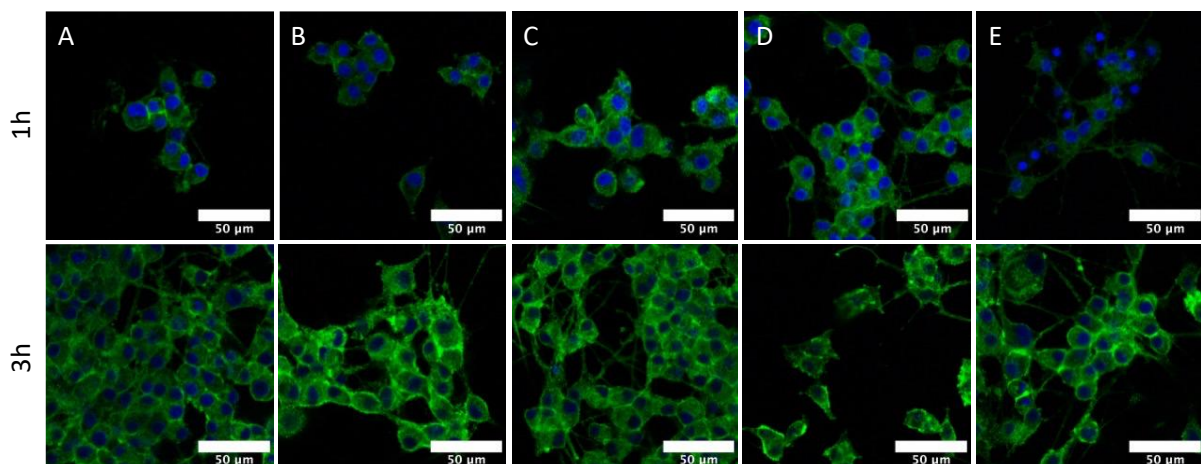


Figure 35 : Évaluation en microscopie à fluorescence de l'internalisation des NPs fluorescentes par les PC12 différenciées après 1 h ou 3 h de contact avec les NP-PLA (A), les NP-PLA-P188 (B), les NP-PLA-P407 (C), les NP-PLA-cP188 (D) ou les NP-PLA-cP407 (E).

Le noyau des cellules est marqué avec le DAPI (bleu), le cytosquelette est marqué avec la phalloïdine (vert) et les NPs apparaissent en rouge (n=1)

Bien que les résultats de microscopie confocale ne confirment pas les résultats trouvés en cytométrie en flux, l'ensemble de ces résultats nous laisse à penser que les NPs fluorescentes seraient préférentiellement internalisées par les PC12 différenciées plutôt que par les cellules RPMI 2650.

IV. Évaluation *in vivo* du passage nez au cerveau

Une fois l'évaluation *in vitro* réalisée, il nous faut maintenant savoir si les NPs sont capables de passer du nez au cerveau. Pour cela, il est nécessaire de réaliser des expériences avec les animaux.

A. Étude de la biodistribution des nanoparticules

Différentes méthodes d'imagerie existent pour visualiser la localisation des formulations après une administration intranasale (IN). Ces méthodes peuvent être similaires à celles utilisées en imagerie clinique chez l'humain, notamment l'IRM, ou encore l'imagerie nucléaire telle que la tomographie par émission de positrons (TEP) ou de photons (TEMP). Mais d'autres techniques d'imagerie existent, notamment la scintigraphie avec des rayons gamma et l'imagerie nucléaire qui est très utilisée pour imager le passage du nez au cerveau. Les images par bioluminescence ou par fluorescence sont également très utilisées chez les animaux de laboratoire. Ces deux dernières ont l'avantage d'être facilement accessibles, rapides, très sensibles et avec une forte résolution spatiale ; leur inconvénient étant la faible pénétration dans les tissus, ce qui fait que ces techniques ne sont pas utilisées chez l'humain. Dans notre cas nous avons utilisé l'imagerie par fluorescence (accessible et avec une forte résolution spatiale). Cette dernière repose sur l'utilisation d'un fluorophore qui, une fois excité, émettra un signal fluorescent qui sera capté par la caméra. Cette technique n'utilise pas de radiation ionisante, est rapide en plus d'être sensible, spécifique avec une forte résolution temporelle et spatiale (211). Le principal inconvénient de cette technique est le risque d'auto fluorescence de l'animal. Pour éviter cela, il est conseillé d'utiliser une sonde fluorescente dans le proche infrarouge, nous avons donc choisi d'utiliser le DiR (λ_{ex} : 750 nm et λ_{em} : 780 nm).

Dans le cadre de ce projet, nous avons choisi le modèle murin SKH1, qui est un modèle sans poil, sans pigmentation mais qui conserve son système immunitaire (264). Ce modèle est privilégié pour les études de biodistribution par imagerie de fluorescence car elles présentent un signal d'auto fluorescence très faible en comparaison avec d'autres souches comme les C57BL/6J par exemple. De plus, l'utilisation d'une souche murine déjà sans poil permet d'éviter de multiples dépilations qui pourraient être fortement inconfortables pour l'animal (265).

Nous avons décidé d'administrer 10 μL de formulation par narine, ce qui est le volume le plus utilisé (197) et qui semble le plus compatible avec le volume de la cavité nasale de la souris de 32 μL (196). Nous avons également choisi une anesthésie par isoflurane, moins impactante pour l'animal, le type d'anesthésie n'ayant pas d'impact sur la biodistribution (201).

Enfin, pour l'administration de la formulation, nous avons choisi d'utiliser une micropipette pour déposer des gouttes à l'entrée des narines qui seront ensuite inhalées lorsque l'animal respire. Cette technique est utilisée majoritairement par les expérimentateurs car elle ne nécessite pas de dispositif particulier et qu'elle est facile à maîtriser (71).

Nous avons décidé de réaliser cette expérimentation en utilisant l'appareil KIS 800 de l'entreprise KaerLabs, également disponible sur la Plateforme du Petit Animal du CRCL (Lyon). Contrairement à d'autres appareils d'imagerie, cet appareil ne possède pas de chambre noire, l'image se prend directement sur la paillasse, la souris étant placée sur une feutrine noire, et respirant l'isoflurane grâce à un masque. L'appareil KIS 800 permet également une capture d'images inférieure à une seconde, ce qui rend les acquisitions à des temps très courts réalisables. Le seul inconvénient de cette technique est que l'appareil capture la fluorescence en 2D, contrairement à certains appareils qui peuvent permettre une visualisation en 3D.

En utilisant les NPs fluorescentes, nous avons obtenu les images présentées dans la Figure 36. Dans un premier temps, nous n'observons pas de fluorescence au niveau des poumons ou de l'estomac des souris, ce qui nous permet de valider la méthode d'administration IN. La fluorescence est localisée au niveau des cavités nasales, sans pouvoir distinguer si cette fluorescence se situe aussi dans le bulbe olfactif ou à proximité. La fluorescence diminue au cours du temps.

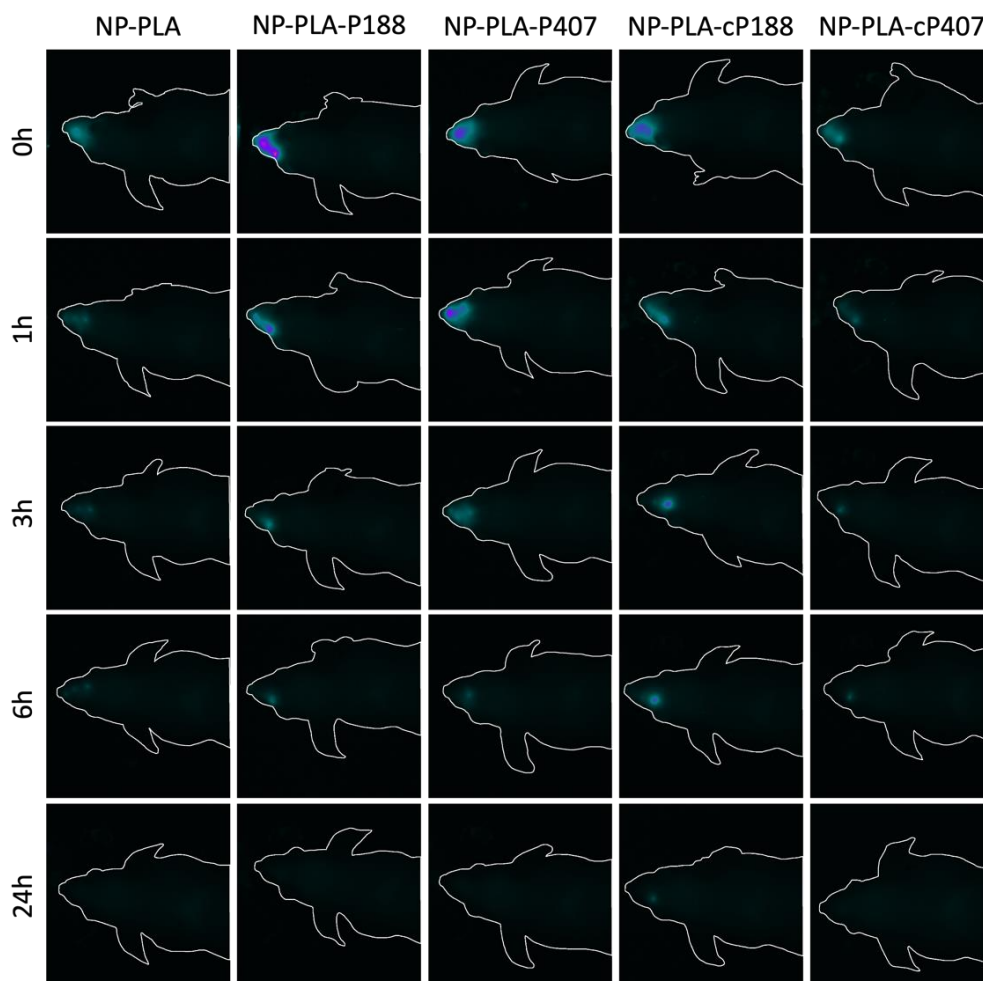


Figure 36 : Image de fluorescence des souris après administration IN des NPs encapsulant le DiR (n=4)

En utilisant le logiciel ImageJ, nous avons pu quantifier la fluorescence au cours du temps (Figure 37). En comparant les formulations avec les poloxamères avec les NP-PLA, il n'y a pas de différence entre les formulations.

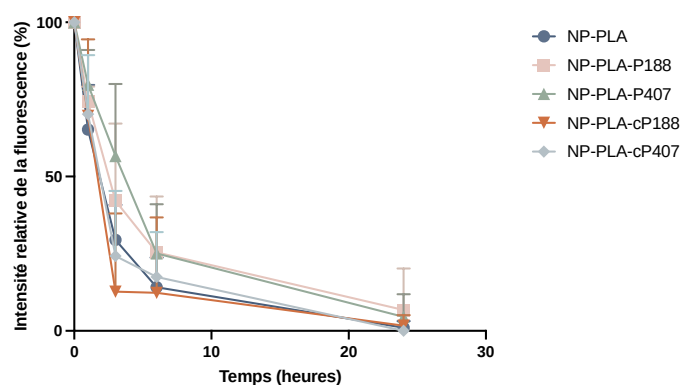


Figure 37 : Quantification avec Fiji de la fluorescence dans la souris, après administration IN des nanoformulations, au cours du temps

(n=4, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ erreur type de la moyenne, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, les NP-PLA sont prises comme formulation contrôle, ns : $p > 0,05$)

Afin d'obtenir des informations plus précises, nous avons ensuite récupéré les cerveaux et poumons des souris 3 h après administration IN. Nous les avons évalués en imagerie par fluorescence et nous avons ensuite quantifié la fluorescence en utilisant le logiciel ImageJ (Figure 38). Lorsque nous observons la fluorescence dans le cerveau des souris, les formulations semblent équivalentes, aucune différence significative n'a pu être mise en avant. Cependant, les NP-PLA ont tendance à moins se retrouver dans le cerveau des souris que les autres formulations et notamment les NP-PLA-P188. En ce qui concerne les poumons, seules les NP-PLA-P407 sont détectées 3 h après administration. A noter qu'une image du cerveau et des poumons a été réalisée chez une souris naïve et aucune fluorescence n'a pu être détectée. La fluorescence présente donc dans les poumons et les cerveaux des souris n'est donc pas liée à un signal d'autofluorescence.

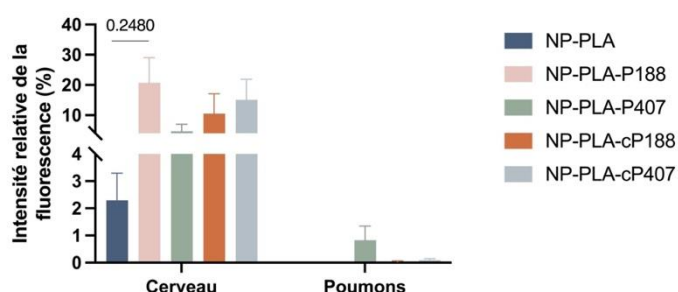


Figure 38 : Quantification de la fluorescence dans le cerveau des souris, 3 h après administration IN, par rapport à la fluorescence administrée ($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ erreur type de la moyenne, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, en utilisant la formulation NP-PLA comme contrôle)

Ces résultats, bien qu'encourageants, ne nous permettent pas de discriminer avec facilité les formulations. Nous avons donc décidé de nous rapprocher plus près du cerveau.

B. Visualisation des nanoparticules dans la cavité nasale et le bulbe olfactif

Afin de déterminer finement la localisation des NPs dans les cavités nasales et le cerveau des souris, nous avons entrepris de sectionner les têtes de souris, et grâce à de la microscopie par fluorescence, déterminer la localisation des NPs.

Pour cela, nous avons administré par voie IN nos formulations encapsulant le DY650 à des souris CB6F1. Cette souche de souris est issue d'un croisement entre les souris C57BL/6 et Balb/c et elle présente un fond génétique plus hétérogène que les souris dont elle est issue (266). Au bout d'une heure, ou de 3 h après l'administration IN, nous avons récupéré et disséqué les têtes des souris afin d'éliminer le maximum de tissus mous à l'extérieur de la tête (voir chapitre 5). Puis nous avons fixé la tête dans du paraformaldéhyde, nous avons ensuite décalcifié l'ensemble pendant une semaine pour enfin congeler la tête dans un milieu

spécifique pour les coupes au cryostat (OCT) (267). Puis, après coupe au cryostat, nous avons pu marquer les coupes avec des anticorps et du DAPI. Nous avons utilisé un anticorps anti-GAP43, protéine retrouvée à la surface des neurones olfactifs dans un état de maturation intermédiaire (268).

Différentes coupes ont été réalisées tout d'abord sur des souris naïves, qui n'ont pas reçu de NPs afin d'observer l'anatomie de la tête des souris. Sur la Figure 39B, nous pouvons observer à plus faible grossissement, les cavités nasales des souris, séparées par le septum. Les cavités sont recouvertes par l'épithélium olfactif caractérisé par la présence de neurones, marqués en vert. Cet épithélium est également assez épais, ce qui permet de le différencier de l'épithélium respiratoire qui est lui, plus fin et sans neurone. En augmentant le grossissement (Figure 39C), nous avons pu voir les neurones avec leurs corps cellulaires au milieu de l'épithélium, et leurs cils dans la cavité nasale. Nous avons pu également observer les faisceaux de neurones, formant des nerfs dans la matrice extracellulaire sur laquelle repose cet épithélium. Enfin, au niveau du bulbe olfactif (Figure 39D), nous observons les différentes couches le caractérisant, la couche glomérulaire et la couche granulaire. La couche glomérulaire est la couche la plus externe du bulbe olfactif, c'est le lieu de synapses des NSO. Entre les deux couches, nous retrouvons la couche plexiforme externe qui contient des dendrites qui forment ensuite des synapses avec les cellules granulaires dont les corps cellulaires sont localisés dans la couche granulaire du bulbe olfactif (269).

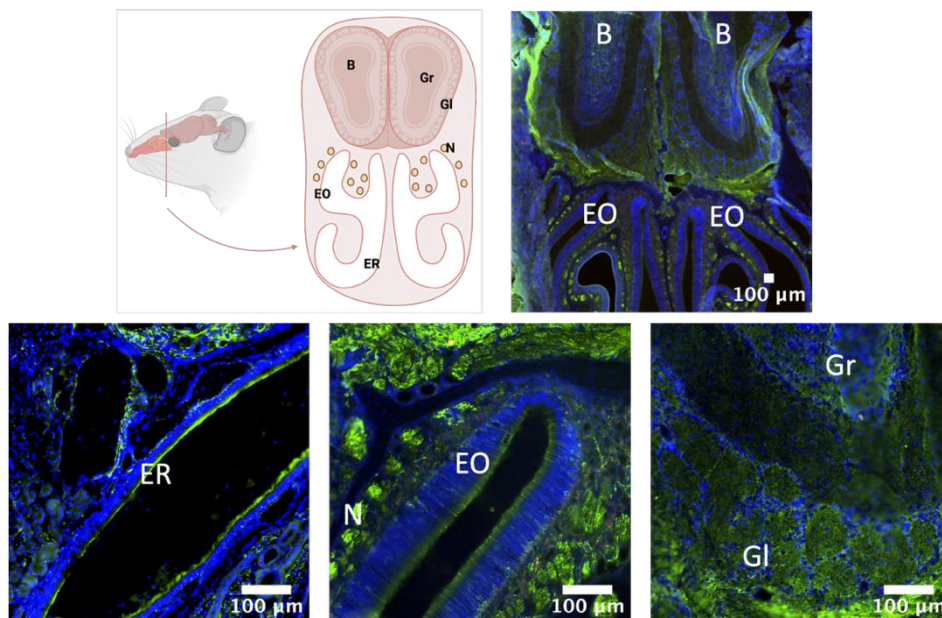


Figure 39 : Schéma et coupes histologiques de la cavité nasale de souris n'ayant reçu aucun traitement.

Les coupes ont été marquées avec le DAPI (pour les noyaux, en bleu) et avec un anticorps anti-GAP43 (neurones immatures, en vert). Différentes structures sont visibles : B : bulbe olfactif, EO : épithélium olfactif, ER : épithélium respiratoire, N : nerf, Gl : couche glomérulaire du bulbe olfactif, Gr : couche granulaire du bulbe olfactif (n=1)

Nous avons observé les coupes effectuées 1 h après administration de NPs fluorescentes (Figure 40) et quelle que soit la formulation, elles ne sont pas réellement localisées dans l'épithélium olfactif mais au-delà de cet épithélium, au niveau de la lame basale. En observant plus en détail le bulbe olfactif, nous observons des NPs dans le bulbe, aussi bien dans la couche glomérulaire que dans la couche granulaire. Qualitativement, il ne semble pas apparaître une différence entre les formulations.

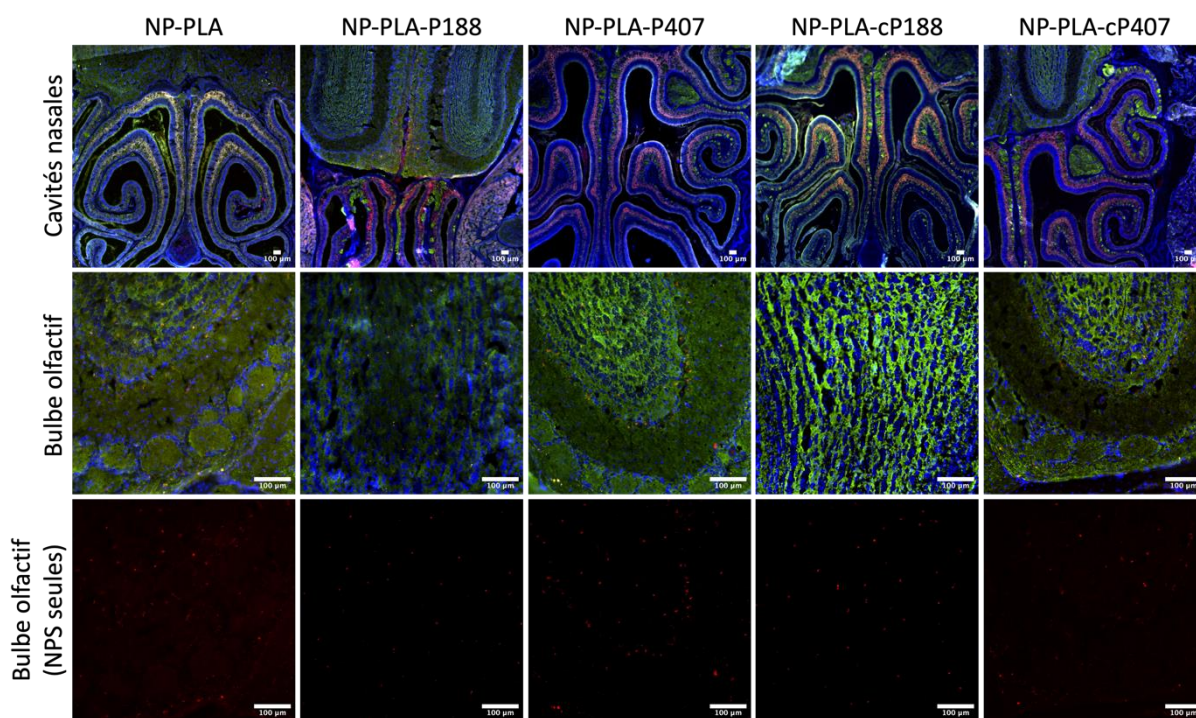


Figure 40 : Coupes histologiques de la cavité nasale de souris 1 h après administration IN de NPs fluorescentes (DY650, en rouge).

Les coupes ont été marquées avec le DAPI (pour les noyaux, en bleu) et avec un anticorps anti-GAP43 (neurones immatures, en vert) (n=1, barre d'échelle 100 μm)

Nous avons ensuite réalisé les mêmes observations 3 h après administration et les NPs sont localisées aux mêmes endroits (Figure 41), mais il semblerait que les NPs soit plus abondantes.

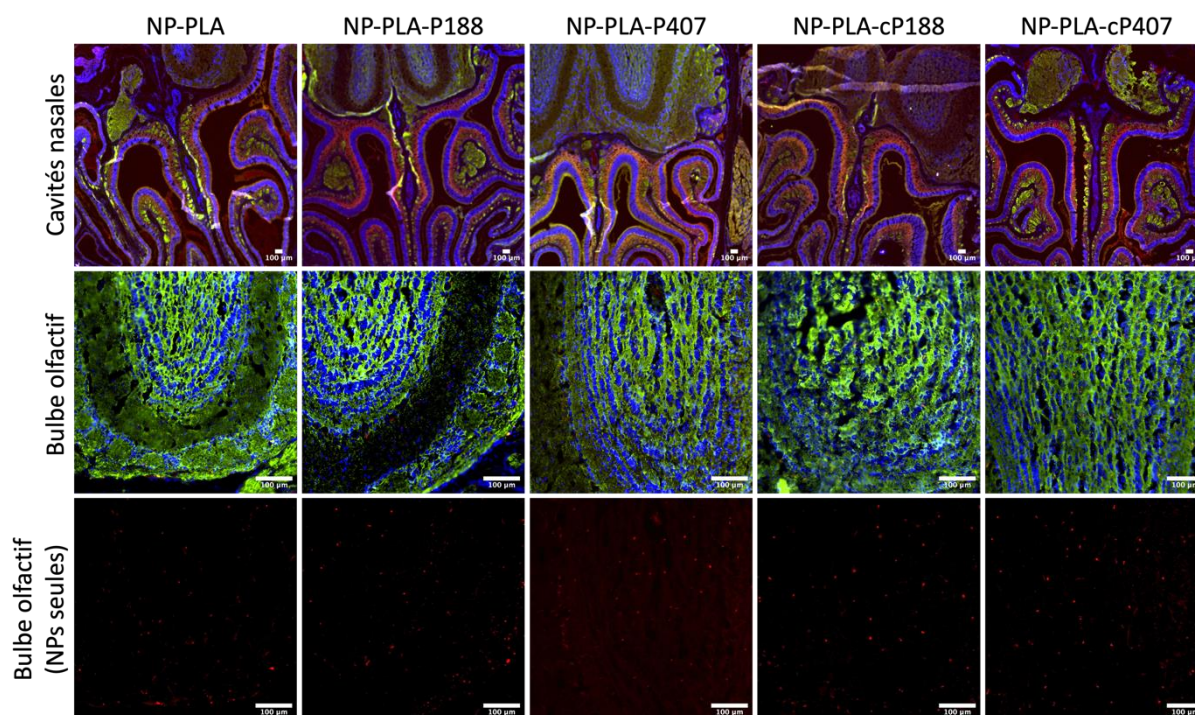


Figure 41 : Coupes histologiques de la cavité nasale de souris 3 h après administration IN de NPs fluorescentes (DY650, en rouge).

Les coupes ont été marquées avec le DAPI (pour les noyaux, en bleu) et avec un anticorps anti-GAP43 (neurones immatures, en vert) (n=1, barre d'échelle 100 μm)

Grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ, nous avons voulu quantifier les NPs dans le bulbe olfactif d'une souris. Pour cela, nous avons pris une dizaine d'images du bulbe olfactif réparties sur plusieurs coupes différentes et nous nous sommes concentrés sur la couche granulaire du bulbe olfactif (Figure 42). Dans un premier temps, 1 h après administration, seules les NP-PLA-cP407 sont significativement plus abondantes dans le bulbe olfactif par rapport aux autres formulations. Cette information ne se confirme pas 3 h après administration, temps auquel les formulations sont toutes présentes en même quantité dans les bulbes olfactifs. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution, les analyses n'ayant été faites que pour une souris pour chaque condition et la différence entre les deux conditions pourrait être uniquement liée à la variabilité interindividuelle. De plus, il pourrait être intéressant de couper et marquer d'autres zones du cerveau pour essayer de différencier les formulations. Il serait essentiel de répéter ces expériences sur un plus grand nombre d'animaux.

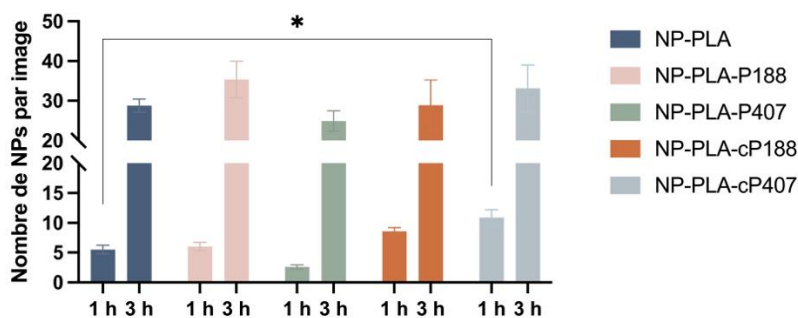


Figure 42 : Quantification du nombre de NPs par image du bulbe olfactif de souris 1 h et 3 h après administration IN de NPs fluorescentes

($n=10$ images, $n=1$ souris, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ erreur type de la moyenne, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, en utilisant la formulation NP-PLA comme contrôle, * : $p < 0,05$ et ns : $p > 0,05$)

Cependant, cette quantification ne nous permet pas de montrer une différence franche entre les formulations. L'ensemble des résultats des études *in vivo* nous laissent penser que les NPs sont capables d'atteindre le bulbe olfactif après une administration IN sans que nous ne puissions voir de différence franche entre les formulations.

V. Discussion et conclusion

Avec pour objectif une application thérapeutique aux pathologies du système nerveux central, l'utilisation des NPs pour une délivrance du nez au cerveau est très prometteuse car les NP-PLA sont considérées comme sûres pour la muqueuse nasale, biodégradables et biocompatibles, elles peuvent améliorer la stabilité de leur chargement et augmenter la pénétration, l'adsorption et la biodisponibilité (17).

Dans ce chapitre, les NP-PLA ont été préparées par nanoprécipitation et optimisées pour s'adapter au mieux à l'ANC. Cette technique permet de modifier la taille des NPs en modifiant différents paramètres comme la concentration de la phase organique, le ratio phase organique/phase aqueuse et la composition de la phase aqueuse. Deux types de poloxamères, P188 ou P407, ont été incorporés soit pendant l'étape de nanoprécipitation, soit adsorbés sur les NP-PLA préformées. Plusieurs concentrations de poloxamères ont été testées afin d'évaluer l'influence de cette concentration sur les différents paramètres physicochimiques des NPs. Ces différents types de synthèse ont produit des NPs homogènes et chargées négativement dont le diamètre étant entre 100 et 150 nm. A la suite de l'analyse des paramètres en fonction de la concentration en poloxamère, la concentration de 5 mg/mL nous a paru la plus pertinente, avec des caractéristiques qui sont favorables à l'ANC car ces NPs sont proches des caractéristiques mises en avant dans le chapitre 1. De même, des NP négatives et positives ont été utilisées pour l'ANC (73,236) et il a été suggéré que les NP négatives utilisaient la voie olfactive et que les NP chargées positivement utilisaient la voie trigéminal (143). Comme le

transport par la voie trigéminal semble beaucoup plus long (17 à 56 h) que par la voie olfactive (1,5 à 6 h) (20), notre recherche s'est donc concentrée sur l'obtention de NPs négatives. Les NPs synthétisées, quel que soit le type de poloxamère ou le type de synthèse, à la concentration 5 mg/mL, semblaient parfaitement compatibles avec l'ANC en termes de taille et de charge.

Pour mieux comprendre l'absence de différence entre les deux types de synthèse, hybrides et couronnes, la modélisation moléculaire des NPs a été réalisée. Au cours des dernières années, des simulations DPD ont été utilisées pour étudier le comportement des NP-PLA avec une variété de petites molécules biologiquement pertinentes (238,242,270). Cette technique a permis d'obtenir des résultats cohérents par rapport à ceux obtenus lors de la caractérisation physicochimique. Les NPs simulées, qui étaient un modèle à échelle réduite 5 fois, mesuraient environ 20 nm, ce qui correspond à nos NPs *in vitro* de 100 nm. La simulation n'a pas montré de forte différence entre les deux types de synthèse, ce qui est en corrélation avec les caractéristiques physicochimiques, confirmant la similarité potentielle des deux formulations. De plus, le modèle *in-silico* explique la surface chargée négativement des NPs et une surface plus hydrophile et un noyau hydrophobe.

Cette surface plus hydrophile peut également expliquer l'amélioration de la stabilité de nos NPs lorsqu'elles sont en contact avec des fluides biologiques simulés. Il a été montré qu'après avoir été en contact avec du mucus nasal artificiel ou du LCR artificiel, les NP contenant du poloxamère, soit P188 ou P407, étaient plus stables que les NP-PLA montrant l'intérêt d'utiliser du poloxamère dans la synthèse afin d'obtenir des NPs adaptées à une utilisation *in vivo*. De plus, l'hydrophobie de surface peut avoir un impact sur la biodisponibilité du médicament, car elle peut déclencher l'opsonisation et l'élimination des NPs de l'organisme. Les NPs contenant du poloxamère sont plus furtives et pourraient mieux éviter d'être éliminées par le système immunitaire comme cela a déjà été démontré dans une étude précédente (88).

L'absence d'impact de nos formulations sur la viabilité cellulaire a ensuite été démontrée. Pour ce faire, les deux principaux types de cellules qui composent la muqueuse olfactive ont été utilisés, à savoir les cellules neuronales et les cellules épithéliales (19). Les cellules PC12 ont été choisies comme modèle neuronal pour leur capacité à se différencier en cellules ayant des caractéristiques neuronales morphologiques et fonctionnelles (152). La lignée cellulaire RPMI 2650 de l'épithélium nasal humain a également été choisie comme modèle de cellules épithéliales. Les formulations n'ont eu aucun impact sur la viabilité des cellules neuronales PC12 ou sur celle des cellules épithéliales RPMI 2650, ce qui suggère qu'elles ne seront pas toxiques pour la muqueuse olfactive après administration IN.

Par la suite, la cytométrie en flux et la microscopie à fluorescence ont été utilisées pour visualiser une internalisation des NPs fluorescentes. La cytométrie en flux nous a permis de montrer que l'internalisation était plus importante par les PC12 différenciées, par rapport aux cellules RPMI 2650. Cela suggère que les NPs fluorescentes pourraient privilégier une voie intracellulaire, via les NSO, pour accéder au bulbe olfactif puis au cerveau. Cependant, cela reste à confirmer car nous avons évalué nos NPs sur des cellules en culture séparément, il faudrait donc observer le comportement des NPs en présence des deux types cellulaires, éventuellement dans un contexte de culture à l'ALI pour visualiser si la présence d'un épithélium reconstruit pouvait influencer le passage des NPs d'un côté à l'autre et nous permettrait de conclure sur ce qu'il est plus probable de se produire *in vivo*.

Après évaluation sur différentes lignées cellulaires, des NP fluorescentes ont été administrées à des souris pour réaliser des études de biodistribution et évaluer la translocation des NPs de la cavité nasale vers le cerveau. Les NPs fluorescentes administrées par voie IN ont pu être visualisées dans la cavité nasale juste après l'administration. Les résultats ont montré que, quelle que soit la formulation, la fluorescence semblait être plus profonde dans la cavité nasale une heure après l'administration IN, puis diminuait avec le temps, jusqu'à être indétectable à 24 heures. Ceci implique une élimination de la formulation de la cavité nasale de la souris. Aucune fluorescence n'était détectable dans le reste du cerveau, probablement en raison de la quantité limitée de fluorescence et de la répartition probable dans l'ensemble du cerveau, ce qui rend la fluorescence très difficile à détecter à l'aide de ce système d'imagerie. D'autres chercheurs ont également utilisé la fluorescence pour évaluer la biodistribution des NPs fluorescentes après une administration IN et ont montré une localisation similaire à ce que nous avons pu observer (271). Nous avons ensuite séparé le cerveau du reste de la souris et nous avons pu observer une tendance des NP-PLA-P188 à se retrouver en plus grande quantité dans le cerveau que les autres formulations. Ces informations sont cependant à mettre en regard avec des techniques qui permettent d'observer plus précisément et de manière plus zoomée cet organe. En effet, même si les images montraient une coloration fluorescente plus proche du cerveau et localisée entre les yeux, là où se trouvent les bulbes olfactifs, la localisation précise n'était pas assez claire. La transparation des cerveaux a été réalisée et a semblé montrer la même tendance que la biodistribution, c'est-à-dire une tendance des NP-PLA-P188 à s'accumuler de manière plus importante dans le cerveau après administration IN.

Dans un second temps, l'immunomarquage de coupes de cavité nasale a été réalisé pour localiser les NPs dans les structures de la tête des souris. Des NP fluorescentes ont été trouvées dans les bulbes olfactifs même une heure après l'administration, et en plus grande

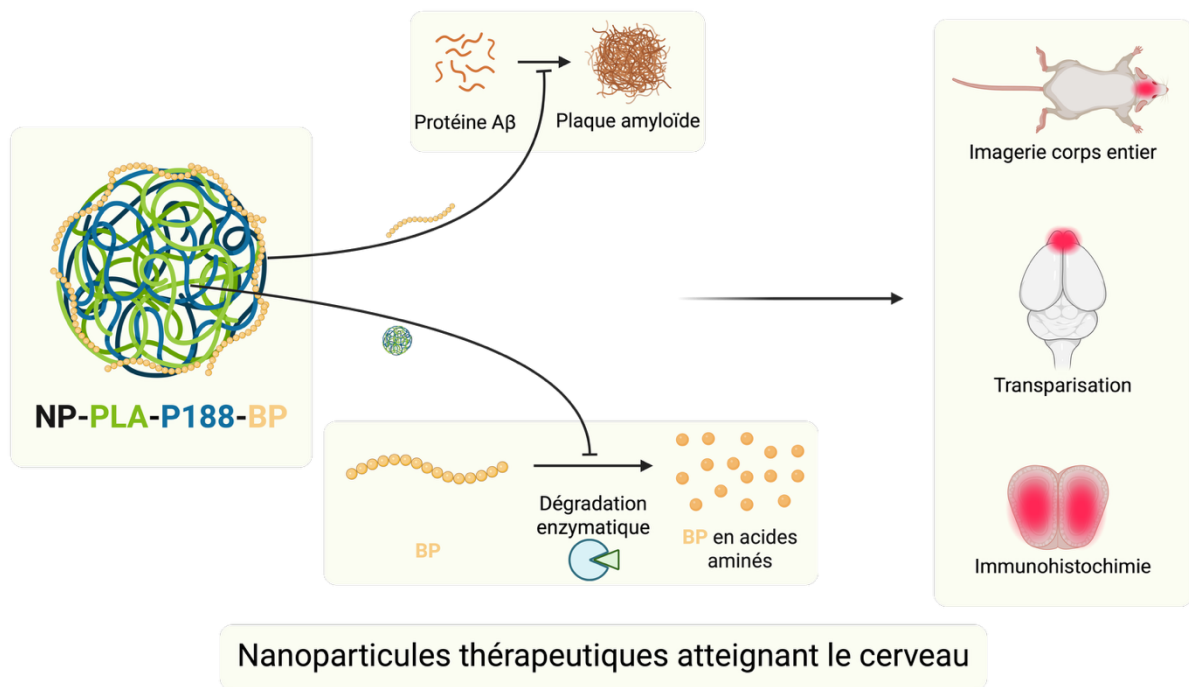
quantité trois heures après l'administration. Ces résultats ont été confirmés en quantifiant le nombre de NPs sur les images de bulbe olfactif. Cependant, cette technique n'a pas permis de mettre en évidence une formulation en particulier, comme cela avait été le cas avec la transparisation ou la biodistribution.

Dans l'ensemble, l'imagerie *in vivo*, la transparisation et l'immunomarquage des bulbes olfactifs ont montré la présence de NPs dans les bulbes olfactifs, ce qui suggère leur utilisation potentielle pour l'ANC de médicaments. Aucune formulation ne semble plus efficace que les autres pour le passage nez-cerveau. Enfin, il est intéressant de noter que lors de l'analyse de la stabilité des NPs en milieu biologique, les NP-PLA n'étaient pas stables. Nous aurions pu penser que cette formulation ne pourrait pas être adaptée pour l'administration IN. Cependant, les études *in vivo* nous montrent que cette formulation est retrouvée dans le bulbe olfactif, de la même manière que les autres formulations. Cette instabilité en milieu biologique artificiel ne semble donc pas être prédictive du devenir des NPs *in vivo*.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats nous a permis de sélectionner une concentration en poloxamère pertinente (5 mg/mL) mais nous n'avons pas pu clairement différencier les cinq formulations restantes pour savoir laquelle serait la plus adaptée à une ANC. Ces formulations étant toutes capables d'atteindre le cerveau, nous avons souhaité les fonctionnaliser avec un médicament pour obtenir une formulation thérapeutique dans le contexte de la MA.

CHAPITRE 3

Nanoparticules contre la maladie d'Alzheimer



Créée avec BioRender.com

Nous avons montré dans les précédents chapitres l'intérêt de développer des nanoparticules (NPs) aux propriétés spécifiques afin de favoriser le passage nez-cerveau. Les études mises en place nous ont permis d'obtenir des NPs polymériques adaptées à l'administration du nez au cerveau (ANC). Ces NPs ont été développées dans l'objectif d'obtenir une plateforme multimodale en permettant d'une part de vectoriser une molécule thérapeutique et d'autre part d'être utilisée comme agent d'imagerie permettant ainsi l'obtention d'un agent théranostique. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur l'évaluation de ces NPs comme agent thérapeutique. Afin de montrer leur potentielle utilisation comme vecteur d'administration de médicament, nous avons souhaité les fonctionnaliser avec une molécule active. Le choix de la pathologie s'est porté sur la maladie d'Alzheimer (MA) et l'utilisation d'un peptide bloquant (BP) développé par les Drs Claire Meissirel et Pauline Bouvet de l'équipe de recherche de l'Institut NeuroMyogène (INMG) et du Laboratoire MeLis (mécanismes en sciences intégratives du vivant). Les travaux présentés dans ce chapitre se concentrent donc sur la fonctionnalisation de nos NPs avec ce peptide et leur évaluation biologique *in vitro* et *in vivo*.

I. Cible thérapeutique

A. La maladie d'Alzheimer

La MA est une maladie neurodégénérative, considérée comme une priorité de santé publique mondiale par l'Organisation Mondiale de la Santé. Elle concerne entre 50 % à 75 % des patients atteints de démence, en particulier les femmes (272). Cette maladie est caractérisée par un déclin progressif de différentes fonctions cognitives comme la mémoire, le langage, les fonctions exécutives, la personnalité et le comportement (273). La MA est principalement caractérisée par deux phénomènes pathologiques conduisant à la neurotoxicité et à la mort cellulaire.

Premièrement, dans des conditions pathologiques, la protéine précurseur de l'amyloïde est clivée en protéine bêta-amyloïde ($A\beta$) et est sécrétée en plus grande quantité que dans des conditions physiologiques, ce qui entraîne l'agrégation de la protéine $A\beta$ en oligomères neurotoxiques et en plaques séniles (272,274). Deuxièmement, la MA est causée par l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Cette dernière est associée aux microtubules et intervient donc dans le cytosquelette. Son hyperphosphorylation diminue son affinité avec les microtubules et augmente son agrégation en enchevêtrements neurofibrillaires toxiques. De plus, la diminution de l'association de Tau avec les microtubules entraîne une altération du transport cellulaire, en particulier le long des axones, ce qui provoque un dysfonctionnement des synapses (275).

Les traitements approuvés par les autorités sanitaires ne font que ralentir la progression de la maladie, ce sont des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase tels que le donézépil, la galantamine et la rivastigmine (272). Il a été prouvé que l'acétylcholine estérase peut favoriser l'agrégation de la protéine A β . En effet, le système cholinergique est essentiel dans le processus d'apprentissage et la mémoire, et les synapses cholinergiques sont largement affectées dans le cerveau atteint de la MA (276). La mémantine, antagoniste du récepteur N-méthyl-D-aspartate, est également utilisée comme traitement (272). Tous ces traitements sont administrés par voie orale (277).

Pour améliorer les traitements existants de la MA, certains médicaments ont été étudiés en combinant l'ANC avec des NPs. La rivastigmine a été chargée dans des NPs de chitosane. Après l'administration intranasale (IN) chez les rats, une plus grande quantité de médicament a été retrouvée dans le cerveau par rapport à l'administration du médicament libre (186). L'huperzine A, qui est également un inhibiteur de l'acétylcholine estérase, a été encapsulée dans des NPs de chitosane fonctionnalisées avec de la lactoferrine et a été largement retrouvée dans le cerveau de souris après administration IN (214). D'autres médicaments tels que la simvastatine, le tarenflurbil et la vinpocétine ont été chargés avec succès dans des NPs polymériques (respectivement NPs de lécithine/chitosane, de PLGA et de chitosane) et ont été retrouvés en plus grande quantité dans le cerveau que le médicament libre après l'administration IN (144,197,208). Malgré des approches prometteuses et leur présence dans le cerveau, ces médicaments n'ont pas été testés pour leur efficacité dans le traitement de la MA *in vivo*. De nouveaux médicaments ont également été développés, comme un peptide neuroprotecteur de huit acides aminés. Il a été encapsulé dans des NP-PEG-PCL conjuguées à de la lactoferrine. Après l'administration IN de ces NPs chez des souris modèles de la MA, différentes caractéristiques biologiques et comportementales ont été améliorées, ce qui suggère la localisation des NPs dans le cerveau et l'efficacité du traitement (103).

L'ensemble de ces études démontre la pertinence de l'utilisation des NPs et de leur utilisation par la voie IN pour la vectorisation d'agents thérapeutiques dans le cadre des maladies neurodégénératives et en particulier de la MA.

B. Action du peptide bloquant

Dans le cadre de la mise en place de cette stratégie de vectorisation d'agent thérapeutique à action cérébrale, nous nous sommes rapprochés de l'équipe de recherche de des Dres Claire Meissirel et Pauline Bouvet qui travaillent sur l'impact du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) dans la dysfonction synaptique dans la MA et la dépression.

Le VEGF est impliqué dans la régulation de processus clés de la fonction synaptique, perturbés dans la MA par la présence d'oligomères d'A β solubles et toxiques. Il a été montré que le VEGF avait un effet neuroprotecteur et qu'une absence de VEGF pouvait induire des maladies neurodégénératives (278). Il a été montré que le VEGF s'accumule à l'intérieur et autour des plaques A β dans les cerveaux post-mortem de patients atteints de la MA et chez les souris APP/PS1, un modèle murin de la MA. Des domaines de liaison spécifiques entre les oligomères A β et le VEGF ont été découverts et cette interaction compromet l'activation du récepteur au VEGF (VEGFR2) dans les neurones. Cette altération de la voie du VEGF dans les modèles de la MA suggère que le rétablissement de l'action du VEGF sur les neurones pourrait remédier au dysfonctionnement synaptique (279).

Ces résultats ont permis de synthétiser un nouveau peptide thérapeutique, le peptide bloquant (BP), basé sur le domaine de liaison du VEGF aux oligomères A β . Il a été montré que le BP était capable d'interagir avec les oligomères A β pour former des agrégats amorphes et d'empêcher l'agrégation de ces oligomères en fibres A β . Le BP permet ainsi de limiter la liaison pathogène des oligomères A β aux synapses. Il a également été montré que le BP permet de limiter l'interaction des oligomères A β avec le VEGF, permettant de conserver son activité sur les synapses, ce qui permet aussi de limiter les dysfonctions synaptiques de la MA. L'ensemble de ces résultats permet de montrer un effet neutralisant du BP sur l'agrégation des oligomères A β et ainsi de leur action pathogène sur les synapses dans la MA (280).

Comme mentionné dans le chapitre 1, la présence d'un environnement légèrement acide dans la cavité nasale ainsi que la présence d'enzymes de dégradation notamment des protéases et des peptidases peuvent dégrader ce BP et empêcher son action cérébrale (38). Une fois de plus, l'utilisation de NPs polymériques semble une solution efficace pour vectoriser le BP et permettre de le véhiculer jusqu'au cerveau.

II. Fonctionnalisation avec un peptide thérapeutique

Le BP (séquence : KRKKSRYKSWSVYVG) est préparé, aliquoté et stocké à -70°C dans une solution d'acide acétique 10 % par l'équipe de la Dre. Claire Meissirel. Ce peptide est chargé positivement à pH 7 avec un point isoélectrique à 11 et une masse moléculaire de 1872 g/mol.

Dans notre équipe de recherche, les NP-PLA ont déjà été largement étudiées pour vectoriser des protéines, notamment la p-24, protéine de la capsid du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Cette protéine a un poids moléculaire de 26 000 g/mol. L'adsorption de cette protéine a pu être réalisée à une hauteur de 99 % (281,282). En suivant le même protocole nous avons mis en contact une solution de NPs avec une solution de BP. Après agitation sur roue pendant 2 h, l'adsorption est considérée comme terminée.

Pour déterminer les meilleures conditions d'adsorption du BP sur les NP-PLA, nous avons comparé, dans un plan d'expériences, trois concentrations de NPs (0,5 %, 1 %, ou 2 %), trois concentrations de BP (5, 40 ou 100 µg/mL) et trois tampons différents (citrate de sodium 5 mM, carbonate de sodium 5 mM et phosphate de sodium 5 mM). Pour évaluer la qualité de cette absorption, différents paramètres ont été évalués avec la diffusion dynamique de la lumière (DLS) : la taille, l'indice de polydispersité et la charge des NPs.

Tableau 3 : Plan d'expérience pour l'adsorption du BP sur les NP-PLA (n=1)

Tampon	[NPs] (%)	[BP] (µg/mL)	Diamètre (nm)	PDI	P. zêta (mV)
Carbonate de sodium 5 mM	0,5	0	171,3	0,247	-36,4
		5	182,1	0,283	-5,89
		40	95,86	0,202	-43,6
		100	97,08	0,205	-42,7
	1	0	137,8	0,319	-39,4
		5	112,9	0,263	-35,3
		40	107,5	0,266	-49
		100	87,93	0,124	-45,5
	2	0	191,8	0,246	-42,5
		5	114,3	0,25	-44,4
		40	88,17	0,12	-45,4
		100	104,3	0,237	-49,3
Phosphate de sodium 5 mM	0,5	0	137,4	0,269	-39,0
		5	490,3	0,262	-5,16
		40	137,8	0,338	-43,7
		100	88,71	0,130	-49
	1	0	157,9	0,251	-45,6
		5	1063	0,782	-39,6
		40	94,51	0,174	-43,5
		100	124,3	0,225	-57,3
	2	0	137,9	0,263	-47,1
		5	102,9	0,206	-41,9
		40	96,36	0,194	-48,8
		100	87,57	0,111	-47,1

Tampon	[NPs] (%)	[BP] (µg/mL)	Diamètre (nm)	PDI	P. zêta (mV)
Citrate de sodium 5 mM	0,5	0	169,0	0,246	-38,7
		5	608,2	0,632	-8,61
		40	100,6	0,201	-45
		100	91,75	0,168	-45,9
	1	0	102,7	0,178	-40,7
		5	173,4	0,389	-40,1
		40	94,24	0,168	-45,5
		100	92,47	0,157	-55,7
	2	0	137,4	0,267	-42,7
		5	95,97	0,159	-47,1
		40	106,5	0,258	-48,3
		100	89,84	0,125	-50,1

Nous avons pu montrer (Tableau 3) que la combinaison d'une faible concentration en NPs et une forte concentration en BP formait des NPs très grandes voire agrégées et dont la charge était très proche de zéro quel que soit le tampon. Les plus fortes concentrations de NPs et de BP permettaient la formation de NPs plus petites dont les paramètres étaient très proches de ceux des NP-PLA sans BP. Les très grandes NPs présentaient généralement un PDI élevée et une charge plus haute alors que les plus petites NPs avaient un PDI plus bas et une charge négative. Dans l'ensemble, nous n'avons pas vu de différence majeure entre les différents tampons utilisés. Nous avons donc choisi de conserver le tampon de synthèse, le tampon carbonate de sodium 5 mM.

Par la suite, nous avons mesuré l'adsorption par la méthode de CBQCA qui permet la détection de protéine jusqu'à 0,5 µg/mL. Cette méthode utilise le 3-(4-carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldehyde (CBQCA) qui permet de quantifier les fonctions amines et notamment celles présentent dans les peptides ou les protéines. La réaction, en présence de cyanure de potassium, permet d'obtenir des composés fluorescents (λ_{ex} : 465 nm et λ_{em} : 550 nm).

Pour être au plus proche des conditions mentionnées dans la Pharmacopée Européenne pour les préparations nasales, nous avons décidé de changer la solution dans laquelle se trouve les NPs comme mentionné dans le chapitre 2. Nous avons donc testé l'adsorption du BP sur nos NP-PLA centrifugées et suspendues en eau et nous avons obtenu des NPs totalement agrégées.

Suite aux résultats obtenus dans le chapitre 2, nous avons fonctionnalisé nos NP-PLA-Poloxamère avec le BP dans l'eau, le poloxamère permettant de stabiliser les NPs. Nous avons donc comparé à nouveau les deux types de synthèse et les deux poloxamères. En regardant le diamètre et l'adsorption mesurée par CBQCA (Figure 43), nous pouvons voir une forte

agrégation des NPs couronnées avec 1 mg/mL de poloxamère. Nous pouvons également remarquer que l'adsorption est plus faible lorsque la concentration en poloxamère est importante (10 mg/mL). Ces résultats confirment ceux exposés dans le chapitre 1 qui mentionnaient déjà la supériorité des formulations avec 5 mg/mL de poloxamère. De plus, à cette concentration, les NPs avec du P188 ont un meilleur taux d'adsorption que celles avec du P407.

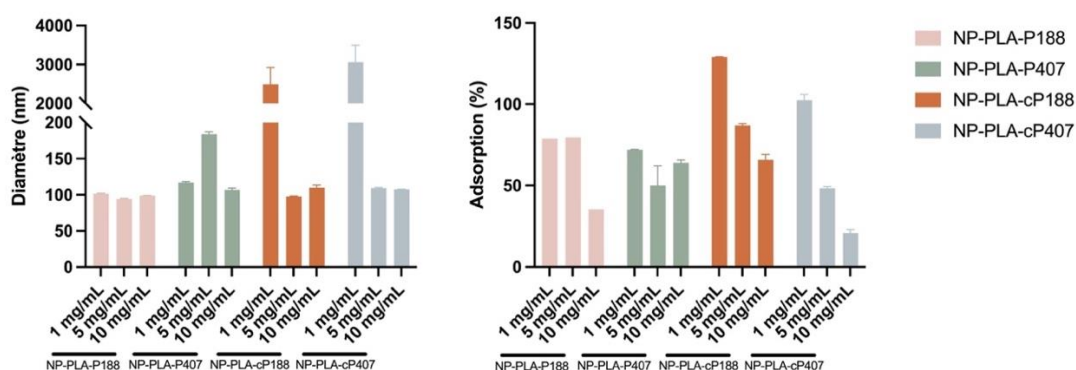


Figure 43 : Adsorption du BP sur des NPs de PLA-poloxamère synthétisées avec les deux types de synthèse et avec les deux types de poloxamère.
Le diamètre est déterminé par DLS et l'adsorption par CBQCA (n=1)

Nous avons donc continué les tests avec les NP-PLA-P188 avec 5 mg/mL de poloxamère après les avoir centrifugées et resuspendues en eau. Nous avons ensuite choisi d'augmenter la concentration de BP ajoutée sur les NPs afin de pouvoir atteindre une dose thérapeutique acceptable après une potentielle dilution. La concentration finale de nos formulations est de 1 % en NPs et 100 μ g/mL en BP. Comme montré dans la Figure 44, nous avons ainsi obtenu des NPs avec un diamètre de $107,5 \pm 2,2$ nm, dont l'homogénéité était de $0,152 \pm 0,037$ et la charge de $-19,5 \pm 2,0$ mV. L'ajout du BP n'a pas modifié les caractéristiques des NPs. L'absorbance du peptide était de $87,5 \pm 5,4$ %.

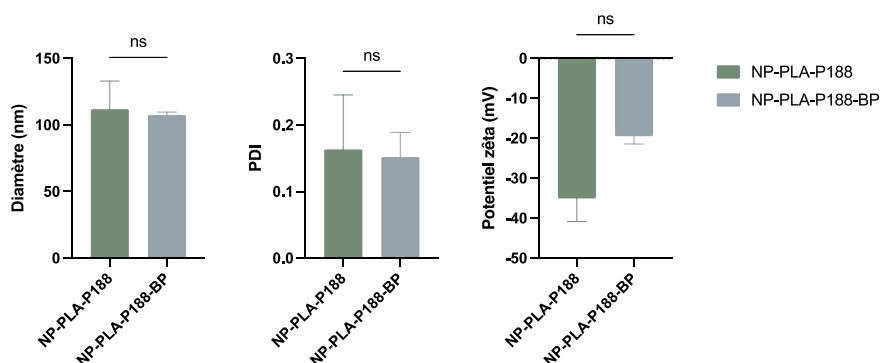


Figure 44 : Caractéristiques des NPs avec ou sans le BP mesurées grâce à la DLS et la mobilité électrophorétique
(n=3, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test de Mann-Whitney, ns : $p > 0,05$)

III. Évaluation *in vitro*

A. Stabilité de l'interaction entre le peptide bloquant et la nanoparticule

Nous avons souhaité vérifier que l'interaction entre le BP et nos NP-PLA-P188 était stable lors de la conservation de la formulation. Pour cela, nous avons suivi l'évolution du diamètre, du PDI, de la charge ainsi que l'adsorption du BP pendant 7 jours, lorsque la formulation est conservée à 4°C. L'analyse de ces différents paramètres nous montre que les NP-PLA-P188-BP sont stables pendant au moins 7 jours à 4°C (Figure 45).

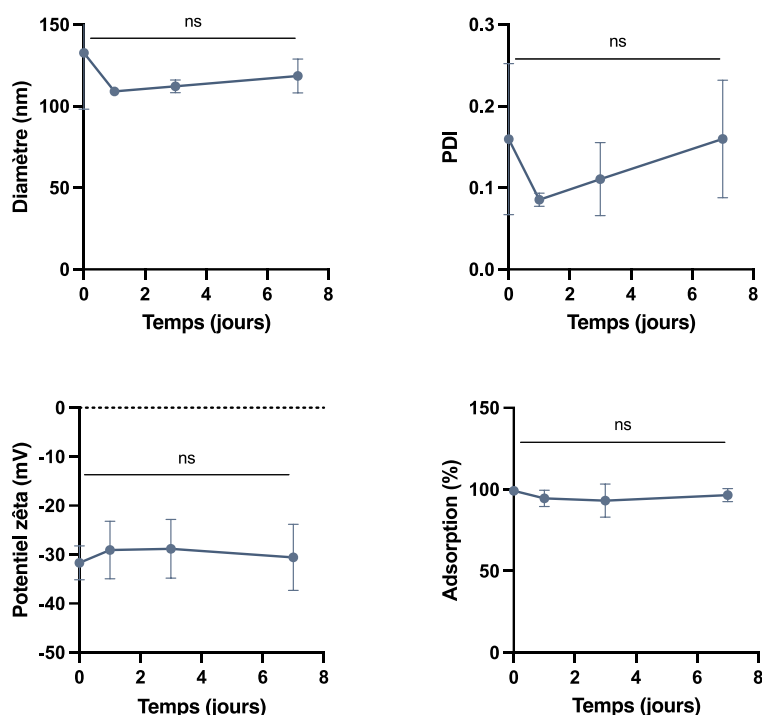


Figure 45 : Stabilité des NP-PLA-P188-BP lors de leur conservation à 4°C

($n=3$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, pas de différence significative par rapport au temps 0, ns : $p > 0,05$)

B. Activité du peptide bloquant

1. Interaction entre le peptide bloquant et la protéine A β et activité anti-amyloïde

Nous avons par la suite souhaité vérifier que l'interaction entre le BP et la protéine A β était possible après l'adsorption de ce dernier sur les NP-PLA-P188. Pour cela, les NP-PLA-P188-BP, les NPs et le BP seul ont été incubés avec des monomères de la protéine A β pendant 2 h à 37°C par l'équipe de la Dre Meissirel. Puis après centrifugation à 10 000 g pendant 10 min, le surnageant et le culot ont été analysés par Western blot pour la détection des différentes

formes de la protéine A β . Lors de la centrifugation, les NPs ainsi que tout ce qui leur est lié seront retrouvées dans le culot. Ainsi, si la protéine A β se lie aux NPs, elle sera détectée dans le culot après centrifugation. Dans le surnageant, nous détecterons les formes libres de la protéine A β ou nous ne détecterons rien si la protéine A β est entièrement liée aux NPs.

En présence de la protéine A β seule (Figure 46 piste 1), nous pouvons noter la présence de monomères, dimères, trimères et tétramères mais également la présence de fibrilles dont le poids moléculaire, très variable, est compris entre 50 et 250 kDa. Dans un second temps, l'analyse des surnageants des différentes formulations (pistes 2 à 5) ont révélé qu'en l'absence du BP, des bandes similaires à celles retrouvées avec la protéine A β seule étaient identifiées (les différents oligomères A β ainsi que les fibrilles) et que toutes ces bandes étaient absentes en présence du BP. Ces résultats sont à l'opposé dans le culot (pistes 7 à 10) : en présence du BP, les protéines A β se retrouvent dans le culot, peu importe leur forme, et en absence du BP, ces protéines A β ne sont pas retrouvées dans le culot. Nous pouvons également remarquer qu'en présence de BP, les fibrilles semblent moins abondantes. Ces résultats permettent de conclure que lorsque le BP est absorbé à la surface des NPs, il est capable d'interagir avec les protéines A β permettant de les retrouver dans le culot plutôt que dans le surnageant.

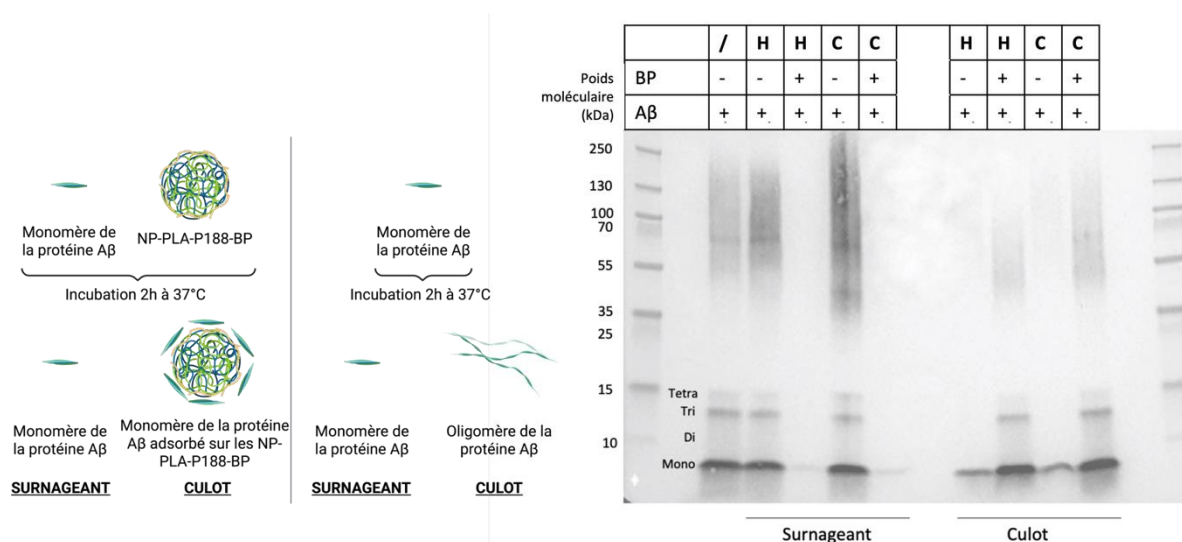


Figure 46 : Évaluation de l'interaction entre la protéine A β et le BP une fois adsorbé sur les NPs composées d'un mix de PLA et de poloxamère 188 (H pour hybrides) et les NPs recouvertes de poloxamère 188 (C pour couronne) (n=1).

Pour vérifier la conservation de l'activité du BP une fois adsorbé à la surface des NPs, le signal pour les différents oligomères (de haut poids moléculaire, de bas poids moléculaire ou les monomères) a été quantifié sur les images du Western Blot grâce au logiciel ImageJ (Figure 47). Pour les oligomères de haut poids moléculaire, il n'y a pas de différence lorsque nous comparons le BP seul ou adsorbé à la surface des NPs. Il n'y a pas non plus de différence entre les formulations à base de NPs. Nous observons des résultats similaires concernant le

taux d'oligomères de bas poids moléculaire ou de monomères. Il est à noter que le BP diminue la concentration des oligomères de haut poids moléculaire mais augmente les concentrations d'oligomères de bas poids moléculaire et des monomères. En effet, il empêche l'agrégation des protéines A β et par équilibre chimique, la « désagrégation » des oligomères de haut poids moléculaire entraîne leur retour à un état d'oligomères de bas poids moléculaire et de monomères, résultant en une augmentation de leur concentration en présence du BP. Ces résultats confirment la conservation de l'activité du BP une fois adsorbé à la surface des NPs. Pour la suite de ces expériences, nous nous sommes concentrés sur l'évaluation des NP-PLA-P188-BP, car comme nous avons pu le montrer dans le chapitre 2, nous n'avons trouvé aucune différence entre ces deux formulations.

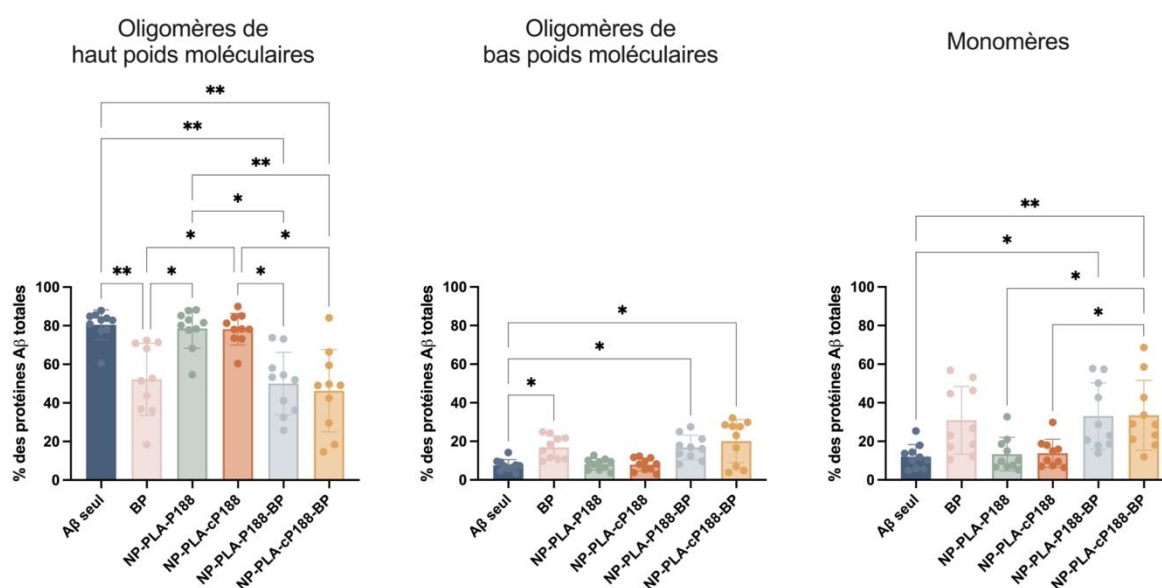


Figure 47 : Quantification des différents oligomères d'A β en présence de différentes formulations (n=10, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, **: $p < 0,005$; * : $p > 0,05$ et ns : $p > 0,05$)

2. Protection contre la dégradation

Nous avons également voulu évaluer l'efficacité des NPs à protéger le BP de la dégradation. Pour cela, la Dre Bouvet a cultivé des neurones humains dérivés de cellules iPS (cellules souches pluripotentes induites), elle a ensuite récupéré le surnageant des cellules et l'a concentré afin d'avoir un milieu riche en chymotrypsine. Ce milieu a ensuite été incubé avec le BP biotinylé (bBP) seul ou adsorbé sur les NPs à 37°C pendant 30 min à deux concentrations différentes.

Tout d'abord, un contrôle est fait en incubant les formulations dans du PBS 1X qui n'a normalement aucune action sur le bBP à 4°C et 37°C (Figure 48 piste 2 et 4). La détection aspécifique a été vérifiée avec le milieu seul (piste 1) et les NPs sans bBP (piste 3). Nous avons

également vérifié que le bBP en présence de trypsine commerciale était bien dégradé (piste 5). Nous avons également réalisé un contrôle de détection du bBP des NP-PLA-P188-bBP sans incubation avec le milieu de culture (piste 6).

Après incubation du bBP avec du milieu de culture (1,25 et 2,5 mg/mL, pistes 7 et 9), nous observons que le peptide est partiellement dégradé, la tâche est gris clair, mais pas totalement inexistante comme c'est le cas quand le bBP est incubé avec de la trypsine commerciale. Nous ne voyons pas d'effet de dose du milieu de culture et pas de différence entre les deux milieux testés (issus de deux cultures différentes de cellules iPS). Lorsque le bBP est adsorbé à la surface des NPs (pistes 8 et 10), la tâche est plus sombre et très proche de ce qui est détecté sans incubation dans du milieu de culture. Là non plus, il n'y a pas d'influence de la concentration ou du milieu de culture utilisé. Ces résultats nous permettent donc de montrer que les NPs peuvent limiter fortement la dégradation du bBP par la chymotrypsine et plus largement de démontrer l'avantage majeur de l'utilisation des NPs qui est la protection du principe actif contre la dégradation.

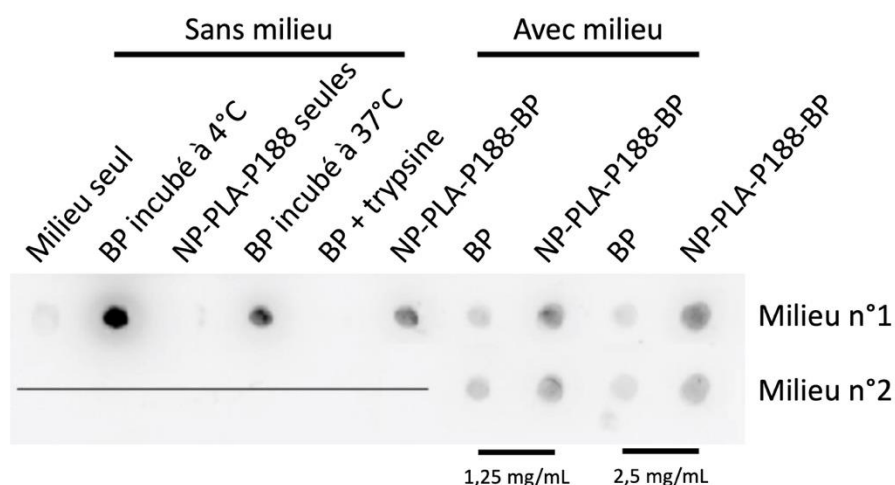


Figure 48 : Dégradation du bBP couplé ou non aux NPs sur Dot Blot en présence de milieu de culture de cellules iPS différenciées en neurones à deux concentrations différentes (détection par un anticorps anti-biotine, puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort, temps d'exposition : 65 secondes, n=3)

C. Viabilité cellulaire en présence du peptide bloquant

La viabilité cellulaire des NP-PLA-P188-BP a été évaluée à la fois sur les RPMI 2650 et sur les PC12 différenciées en cellules neuronales comme expliqué dans le chapitre 2. Les cellules ont ensuite été incubées avec les NPs pendant 24h puis leur viabilité a été mesurée par la méthode du PrestoBlue.

D'après les résultats montrés dans la Figure 49, la présence du BP n'a pas impacté la viabilité cellulaire. Les cellules épithéliales nasales humaines RPMI 2650 et les cellules neuronales différenciées de rat PC12 ne semblent pas impactées par l'ajout du BP sur les NPs.

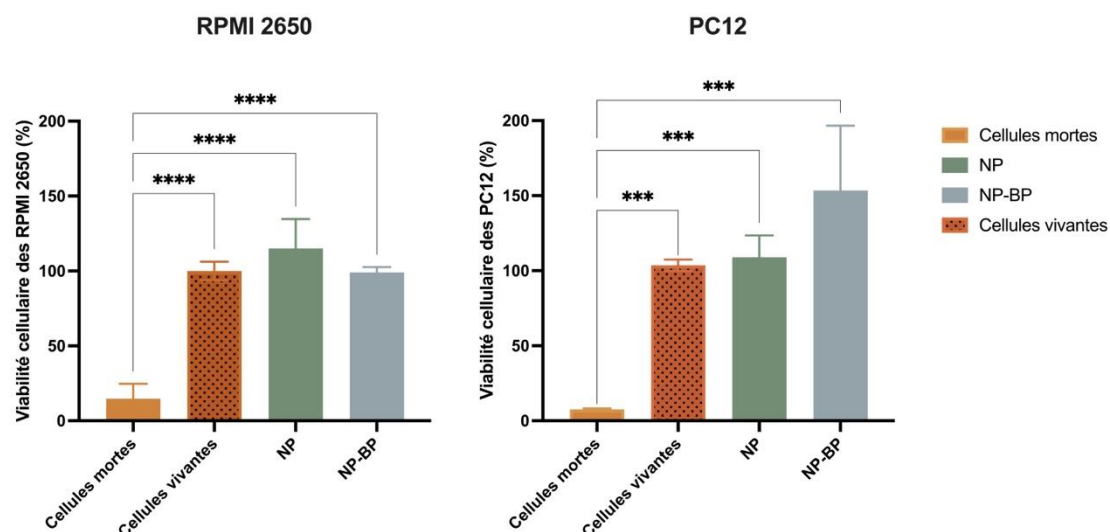


Figure 49 : Évaluation de la viabilité des cellules épithéliales nasales RPMI 2650 et des cellules neuronales différenciées PC12 après 24 h de contact les NP-PLA-P188 ou les NP-PLA-P188-BP ($n=3$, sauf pour les PC12 au contact des NP-PLA-P188-BP où $n=2$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type, test Anova suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett, la normalité des données a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk, **** : $p < 0,0001$ et *** : $p < 0,005$)

D. Internalisation par les cellules

Nous avons ensuite déterminé si la présence du BP modifiait l'internalisation des NPs fluorescentes par nos deux types cellulaires. Pour cela, nous avons utilisé la cytométrie en flux et quantifié le nombre de cellules ayant internalisé des NPs. Dans un premier temps, nous pouvons noter que les NPs fluorescentes semblent internalisées en plus grande proportion 3 h après l'incubation, par rapport à seulement 1 h après (Figure 50A). Nous observons également une tendance à une meilleure internalisation par les PC12 différenciées, pour les deux formulations, et nous ne voyons pas de différence significative entre les formulations. Nous pouvons donc penser que l'ajout du BP ne modifie pas l'internalisation des NPs par les cellules, à la fois les RPMI 2650 et les PC12 différenciées.

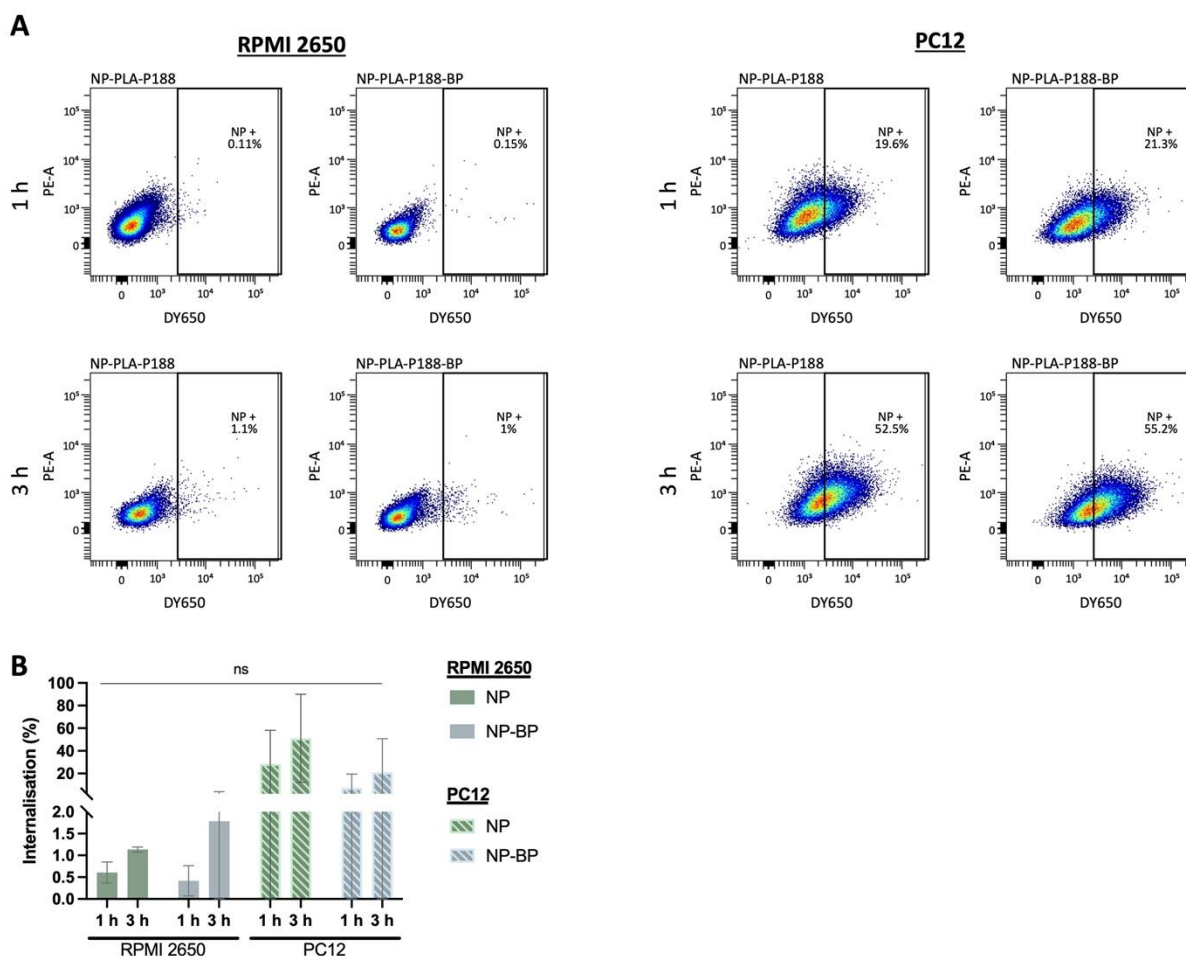


Figure 50 : Évaluation de l'internalisation des NP-PLA-P188 et des NP-PLA-P188-BP fluorescentes par les RPMI 2650 et les PC12 différenciées après 1 h ou 3 h d'incubation.

Les cellules seules ont été isolées puis les cellules qui contiennent des NPs fluorescentes sont également isolées (A). L'internalisation est évaluée par le pourcentage de cellules seules fluorescentes par rapport aux cellules seules totales ($n=3$; les données sont présentées comme moyenne $\pm$ écart type, test multiple de Wilcoxon pour comparer les deux formulations, les deux types cellulaires et les deux temps, ns : $p > 0,05$)

IV. Évaluation *in vivo*

A. Biodistribution

Nous avons ensuite souhaité évaluer la biodistribution des NP-PLA-P188-BP chez la souris par imagerie en fluorescence, grâce aux NPs encapsulant le DiR. Nous avons dans un premier temps synthétisé les NP-PLA-P188-DiR, puis nous avons adsorbé le BP à leur surface et nous n'avons pas observé de différence en termes de paramètres physicochimiques.

Les NP-PLA-P188-BP fluorescentes ont été administrées par voie IN chez des souris SKH1 dans les mêmes conditions qu'expliqué dans le chapitre 2. Lorsque nous observons les images prises par l'appareil KIS 800 (Figure 51A), nous observons une localisation des NP-PLA-P188-BP similaire à celle des NP-PLA-P188. Au temps d'administration, le signal est localisé

dans la cavité nasale et indétectable dans le reste du corps, suggérant une administration réussie et peu de déglutition de la souris. Puis, 1 h après administration, le signal semble être plus important dans le fond des cavités nasales et au niveau du bulbe olfactif. Le signal reste ensuite localisé au même endroit mais diminue en intensité, suggérant une dispersion et une élimination progressive des NPs. Nous avons également quantifié le signal fluorescent (Figure 51B), et nous observons également une diminution progressive du signal au cours du temps. En revanche, il n'y a pas de différence significative de quantité de fluorescence entre les différentes formulations.

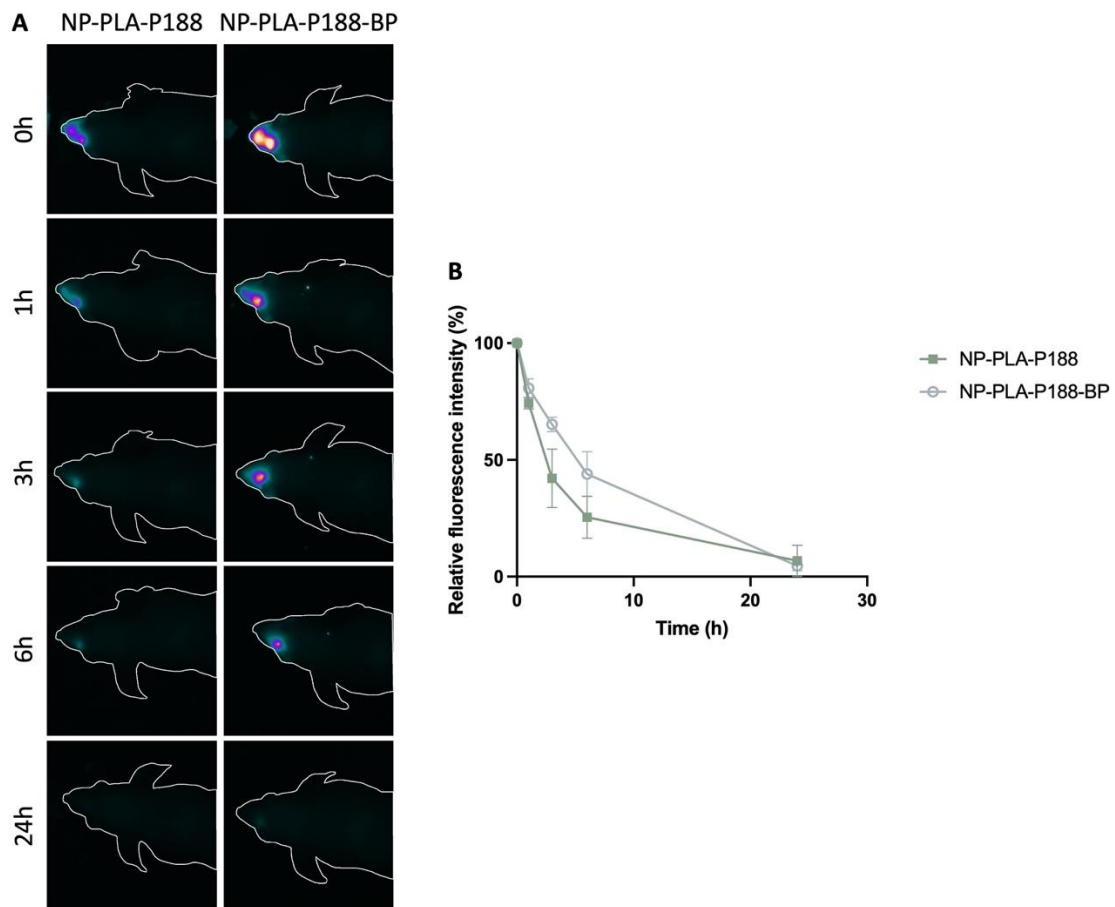


Figure 51 : Biodistribution des NP-PLA-P188-BP et des NP-PLA-P188 chez la souris.
(A) Images de fluorescence des souris après administration IN des NPs fluorescentes (la souris la plus pertinente par la localisation de la fluorescence est montrée). (B) Quantification avec Fiji de la fluorescence ($n=4$, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ erreur type de la moyenne, test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn, les NP-PLA-P188 sont prises comme formulation contrôle, ns : $p > 0,05$)

Ces résultats nous montrent que la présence du BP n'impacte pas la biodistribution des NPs dans la souris.

B. Transparisation

Nous avons ensuite visualisé la localisation des NPs au niveau du cerveau entier des souris. Pour cela, nous avons récupéré les cerveaux de souris auxquelles nous avons administré des NPs fluorescentes (DY650) par la voie IN. Les souris ont été euthanasiées puis perfusées par la voie intracardiaque avec du PFA 4% avant de récupérer les cerveaux. Ces organes ont ensuite été fixés, perméabilisés puis rendus transparents. Nous avons pu ensuite les observer avec un microscope à feuillets de lumière. Les résultats (Figure 52) obtenus ne nous permettent pas de discerner les NPs fluorescentes dans le bulbe olfactif ou dans le cerveau.

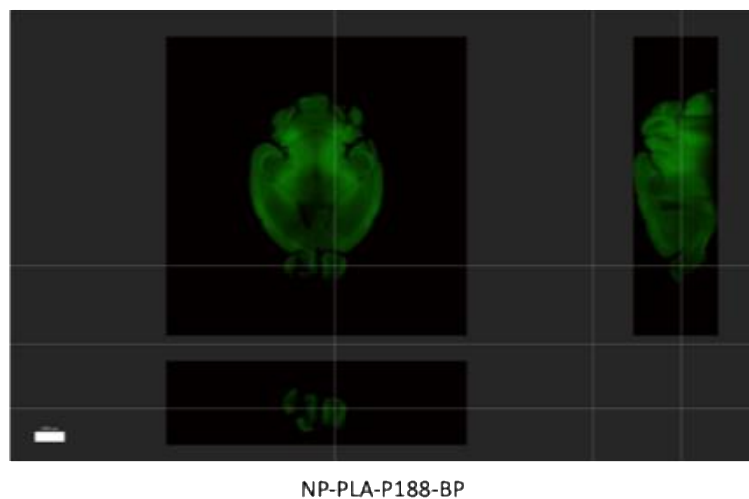
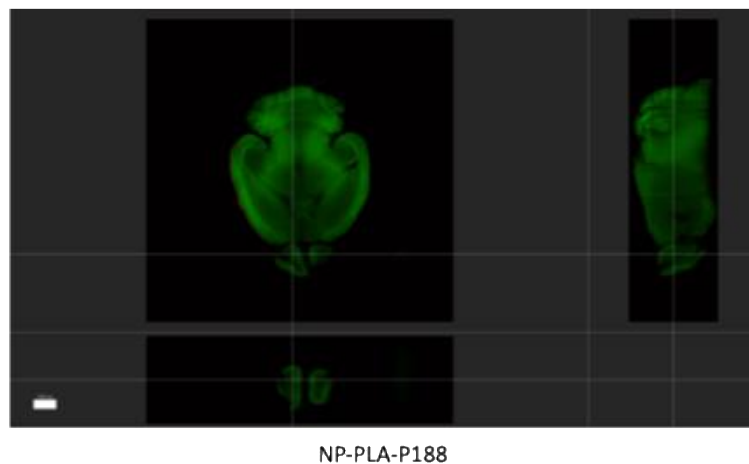


Figure 52 : Observation des cerveaux rendus transparents de souris ayant reçu des NP-PLA-P188 ou des NP-PLA-P188-BP fluorescentes (DY650) par voie IN (n=1)

C. Kratoscope

Afin d'obtenir des informations sur l'entière du cerveau en gardant la précision obtenue en immunohistochimie, nous nous sommes tournés vers la technique du Kratoscope développée par la société Kaer Labs. Cette technique permet à partir d'échantillons congelés de couper et d'imager simultanément et de manière automatisée. Une fois chaque coupe imagée, une reconstruction en 3D est possible.

Nous avons utilisé cette technique pour comparer une souris naïve et une souris à laquelle nous avons administré des NP-PLA-P188-BP, 3 h après l'administration IN. Les images obtenues (Figure 53) montrent la présence de NPs fluorescentes au niveau de la cavité nasale, dans les cornets olfactifs de la souris mais nous ne voyons pas de NPs dans le bulbe olfactif ni dans le cerveau.

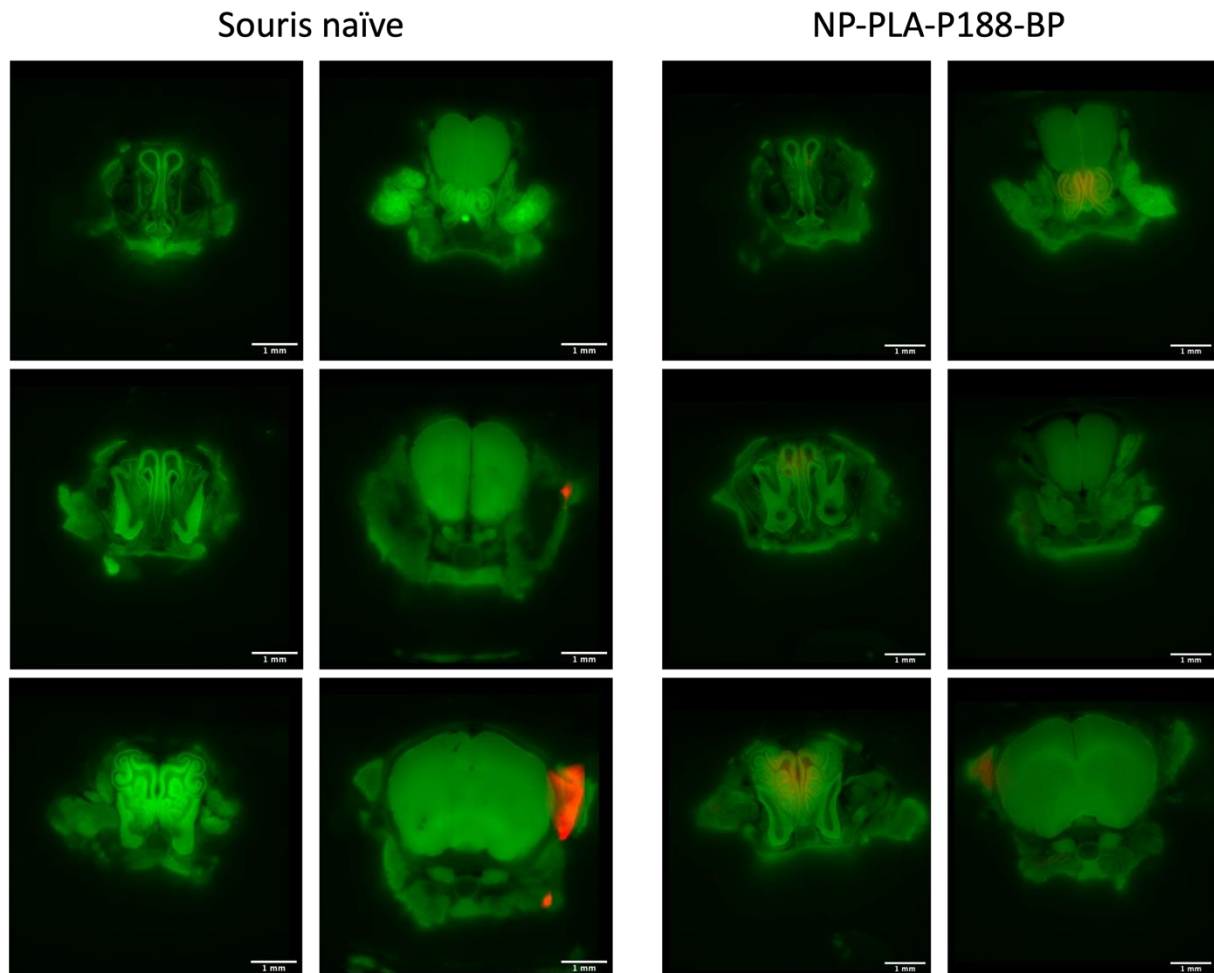


Figure 53 : Coupes de cavités nasales de souris naïve ou ayant reçu des NP-PLA-P188-BP fluorescentes par voie IN, observées grâce au Kratoscope.

Le vert représente l'auto fluorescence des tissus et le rouge correspond au DY650 encapsulé dans les NPs (n=1)

D. Immunohistochimie

Nous avons voulu confirmer ces résultats de manière plus spécifique. Nous avons donc réalisé à nouveau des coupes de cavités nasales de souris ayant reçu les NP-PLA-P188-bBP par voie IN. Après fixation, décalcification et congélation, comme décrit dans le chapitre 5, nous avons pu réaliser des coupes au cryostat de 15 μm d'épaisseur. Nous avons réalisé un marquage DAPI pour les noyaux et un marquage avec un anticorps anti-GAP43 pour les NSO immatures ; nous avons administré des NPs fluorescentes (DY650) et le BP était biotinylé.

Nous n'avons pas réussi à obtenir un contrôle négatif exploitable. En effet, nous avons marqué séparément le bBP avec deux streptavidines différentes couplées à un fluorochrome et nous avons systématiquement obtenu un marquage aspécifique de cette streptavidine. Ainsi nous n'avons pas évalué la localisation du BP biotinylé mais uniquement des NPs fluorescentes. Les résultats nous permettent donc d'évaluer la localisation des NPs mais nous ne pouvons pas vérifier que le bBP est localisé au même endroit. Les images du bulbe olfactif antérieur (Figure 54), nous permettent dans un premier temps de confirmer la présence des NP-PLA-P188-bBP dans le bulbe olfactif 1 h et 3 h après administration IN. L'ajout du bBP ne modifie donc pas le passage des NPs dans le bulbe olfactif. Nous observons la même tendance visible sur les images de biodistribution et la quantification de la biodistribution, c'est-à-dire que les NP-PLA-P188-bBP semblent passer en plus grand nombre dans le bulbe olfactif. Il faudrait tout de même pouvoir vérifier si le BP est maintenu sur les NPs ou bien si sa localisation est différente, notamment grâce à un anticorps spécifique du BP ou bien coupler le BP directement avec un fluorophore.

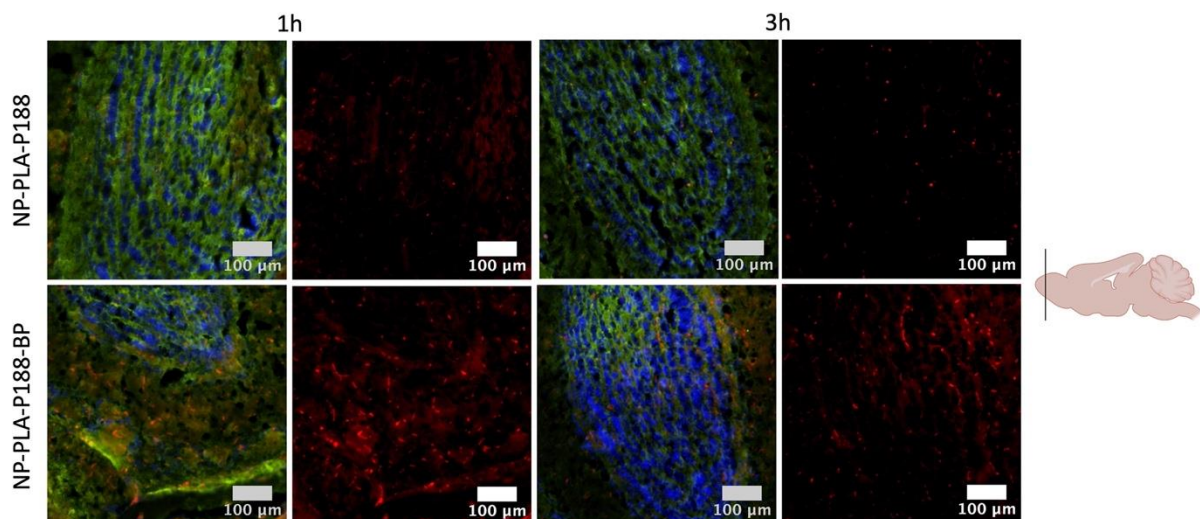


Figure 54 : Immunohistochimie du bulbe olfactif antérieur après administration de NP-PLA-P188 ou de NP-PLA-P188-bBP, 1 h ou 3 h après administration intranasale.

Les noyaux ont été marqués au DAPI, les neurones immatures sont marqués avec un anticorps anti-GAP43 et les NPs encapsulent le DY650 (rouge) ($n=1$). A droite, la zone de coupe est visualisée sur le schéma du cerveau de la souris.

Enfin, nous avons regardé plus loin dans le cerveau (Figure 55) et nous avons visualisé les NP-PLA-P188 et les NP-PLA-P188-BP au niveau du cerveau de la souris 1 h et 3 h après administration IN. Nous pouvons également observer que ces NPs semblent plus abondantes dans le cerveau 3 h après l'administration. Les NPs sont donc capables de se déplacer de la cavité nasale, vers le bulbe olfactif, puis vers le cerveau.

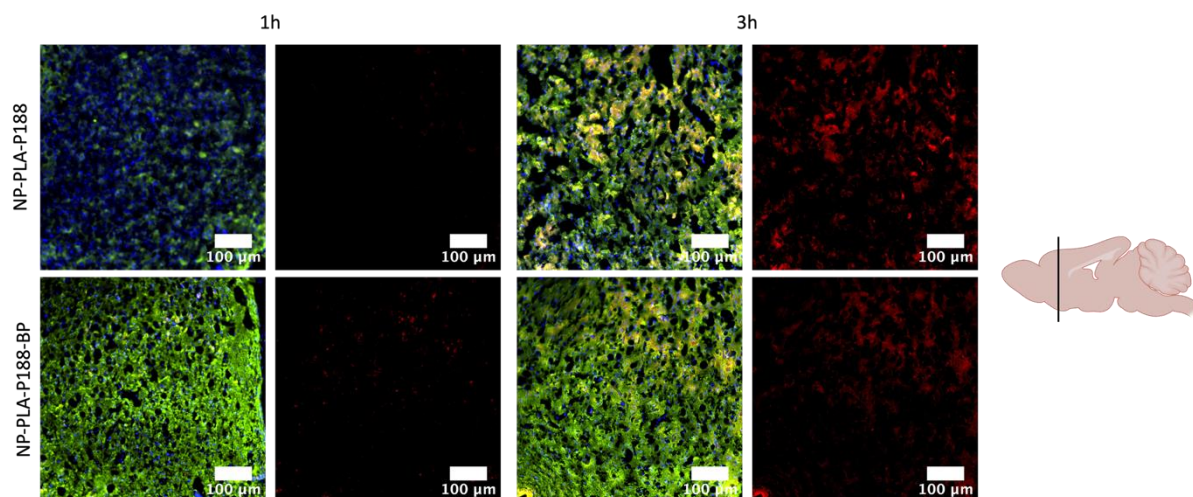


Figure 55 : Immunohistochimie du cerveau après administration de NP-PLA-P188-BP ou de NP-PLA-P188, 1 h ou 3 h après administration IN.

Les noyaux ont été marqués au DAPI, les neurones immatures sont marqués avec un anticorps anti-GAP43 et les NPs encapsulent le DY650 (rouge) (n=1). A droite, la zone de coupe est visualisée sur le schéma du cerveau de la souris.

V. Discussion et conclusion

Dans le cadre de ce troisième chapitre, nous avons utilisé les NPs polymériques adaptées à l'ANC pour vectoriser un peptide thérapeutique permettant de limiter l'agrégation des oligomères A β toxiques responsables de la MA. Après optimisation des paramètres de fonctionnalisation, en modifiant le tampon d'adsorption mais également les concentrations en NPs ou en BP, nous avons obtenu deux formulations différentes : les NP-PLA-P188-BP et les NP-PLA-cP188-BP. Ces deux formulations présentent un diamètre inférieur à 120 nm et une adsorption du BP supérieure à 90 % permettant d'obtenir des NPs avec suffisamment de BP pour atteindre la dose thérapeutique de 15 μ M. D'après les charges des NPs et celle du BP, nous pouvons penser que cette adsorption se fait par interactions électrostatiques. De plus, nous avons pu montrer que cette interaction était stable lors de la conservation à 4°C pendant au moins 7 jours.

Nous avons ensuite montré, grâce à nos collaborateurs, que le BP était capable d'interagir avec la protéine A β de la même manière lorsqu'il est libre et lorsqu'il est sur la NP. De plus, lorsque nous quantifions les différentes espèces d'A β après avoir été en contact avec

le BP ou les NP-BP, nous avons démontré que l'activité du BP était conservée après son adsorption sur les NPs. Cela nous permet de dire que le BP, même adsorbé à la surface des NPs, permet de limiter la formation d'oligomères A β de haut poids moléculaire, responsables de la MA. Enfin, nous avons également pu démontrer l'effet protecteur des NPs qui limitent la dégradation du BP par la chymotrypsine issue de cellules iPS. De plus, nos résultats montrent également que nos formulations n'impactent pas la viabilité cellulaire des cellules épithéliales nasales RPMI 2650 ni des cellules neuronales PC12 différenciées, ni l'internalisation préférentielle des NPs par les PC12 différenciées. Ces résultats suggèrent que les NP-PLA-P188-BP pourraient permettre de protéger le BP de la dégradation, bloquer la formation de plaque A β , limitant ainsi la propagation de la MA *in vivo*, sans pour autant compromettre la viabilité des cellules avoisinantes, ni leur trajet intracellulaire potentiel dans les NSO.

Enfin, nos études *in vivo* montrent que l'ajout du BP n'impacte pas fortement la localisation des NPs dans la souris. L'utilisation d'autres techniques qui permettent de voir l'organe dans son entièreté, comme la transparisation ou le Kratoscope, n'ont pas permis d'observer les NPs dans le bulbe olfactif ou dans le cerveau. Cela peut être dû à un signal des NPs fluorescentes pas assez puissant ou bien trop diffus, qui n'est alors pas capté par le microscope à feuillets de lumière ou bien le Kratoscope, alors que la microscopie à fluorescence est plus sensible. Les analyses des coupes de cavités nasales après un marquage immunohistochimique nous ont permis d'observer les NPs dans le cerveau des souris après administration IN.

Ces résultats sont très prometteurs pour l'utilisation des NP-PLA-P188-BP comme traitement de la MA. La suite du projet serait maintenant de comparer l'effet du BP seul par rapport à son effet quand il est adsorbé sur les NPs afin de vérifier l'efficacité du traitement *in vivo*. Cela permettrait de montrer l'intérêt de combiner la voie nasale et les NPs pour l'administration de ce traitement. Les études d'efficacité thérapeutique du BP passeraient d'abord par l'usage des animaux et le choix du modèle est important. Certains modèles sont plutôt accessibles comme celui utilisé par Liu *et al.* Ce sont des souris albinos auxquelles les chercheurs ont injecté directement dans le cerveau des monomères de la protéine A β et de l'acide iboténique afin de créer leur modèle de souris mimant la MA (103). La co-injection de ces deux produits produit une perte neuronale importante. D'autres modèles de souris pourraient être utilisés pour évaluer l'action du BP. Les souris APP/PS1 ont été utilisées par l'équipe de la Dre Meissirel pour évaluer l'activité du BP directement sur des coupes d'hippocampe ou sur des cultures de cellules primaires de l'hippocampe (280). Ce modèle comporte deux mutations, celle de la protéine précurseur de l'amyloïde et celle de la protéine préséniline. Les souris APP/PS1 présentent des dépôts A β dès 6 semaines et ces dépôts

s'accumulent dans le cortex et l'hippocampe à 8 mois. Ce modèle présente également une hyperphosphorylation de la protéine Tau à proximité des dépôts A β . Il est donc très adapté à la modélisation de la MA. D'autres modèles, comme les souris Tg2576 ou 5xFAD, présentent aussi des dépôts A β au niveau de l'hippocampe et du cortex après 6-11 mois. Ces trois modèles, bien qu'adaptés à la modélisation de la physiopathologie liée aux protéines A β , ne présentent peu ou pas de modification de la protéine Tau, aussi responsable de la MA. Les souris 3xTg-AD miment les deux aspects de la MA et semblent également être un modèle adapté (283). Une fois le modèle choisi, l'efficacité du traitement serait évaluée par des tests comportementaux principalement. C'est le cas de Sunena *et al.* qui ont réalisé des tests de labyrinthe de Morris et de labyrinthe surélevé pour évaluer la mémoire des souris (68). Ces tests comportementaux peuvent être complétés par une analyse de l'activité de l'acétylcholine estérase dans l'hippocampe et une analyse histologique du cerveau avec une coloration de Nissl qui met en avant les corps cellulaires et le réticulum endoplasmique granuleux des tissus nerveux (103). Cependant, tous ces modèles doivent être âgés pour présenter les signes de la MA. Compte tenu de leur spécificité et de l'âge qu'elles doivent atteindre, ces souris représentent un coût non négligeable et ne sont donc utilisées qu'en fin de protocole. De plus, les méthodes d'évaluation de la MA chez les souris nécessitent du matériel bien spécifique et beaucoup de temps d'apprentissage pour pouvoir évaluer la perte de mémoire par exemple. Bien que ces études soient primordiales pour pouvoir confirmer la possible utilisation du BP adsorbé à la surface des NPs pour traiter la MA, ces dernières n'ont pas pu être réalisées pendant la durée de ce travail de thèse.

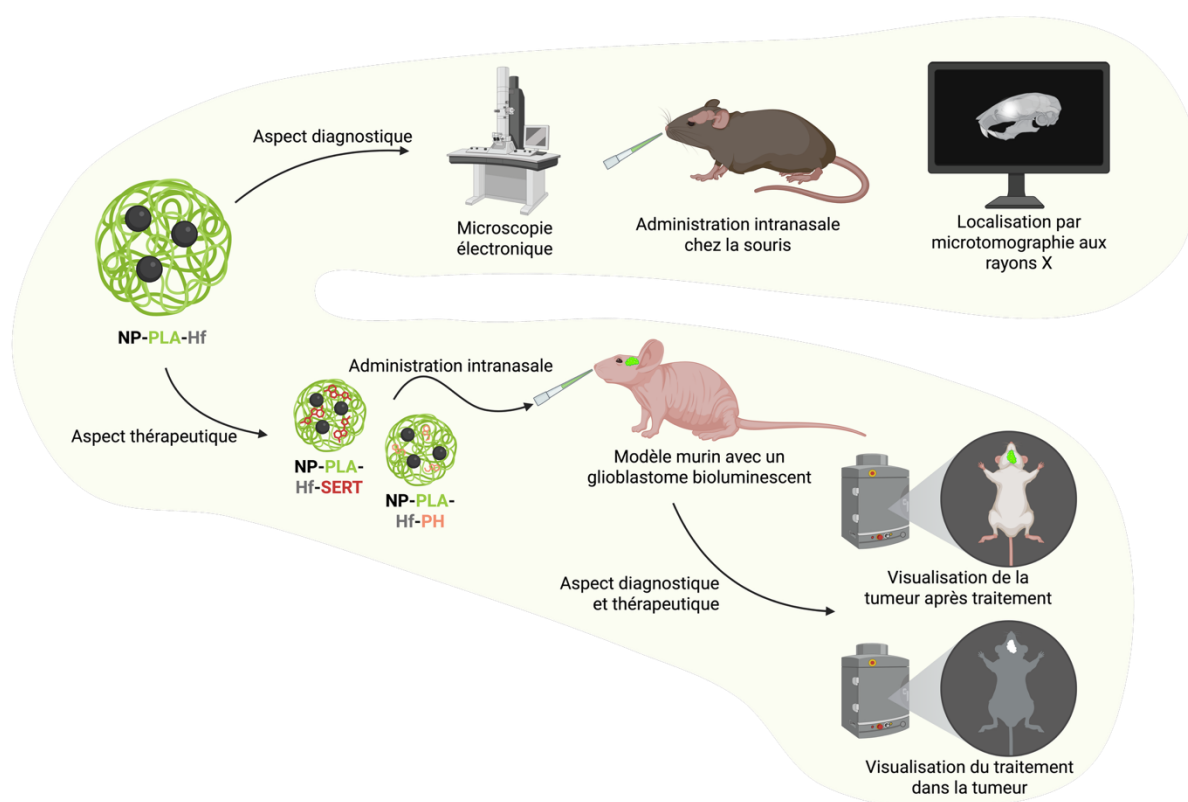
Comme nous l'avons montré dans le chapitre 2 avec les tests en utilisant le mucus et le LCR, les évaluations *in vitro* peuvent parfois ne pas être aussi prédictives de ce qu'il se passe *in vivo* que nous l'imaginons. Il serait donc très intéressant de vérifier l'efficacité du traitement par le BP administré par voie IN à l'aide d'un modèle murin de la MA. En revanche, nous pouvons être optimistes sur les résultats espérés car d'autres molécules ont été administrées par la voie IN et ont montré leur efficacité sur des pathologies (25,284–287). C'est le cas de l'insuline qui est étudiée pour une administration IN à un stade très avancé puisque de nombreux essais cliniques existent pour le traitement de différentes pathologies comme l'obésité, le diabète de type 2, les troubles cognitifs légers et la démence (284). D'autres peptides, plus proches de la taille de notre BP, comme le NAP, le NF- κ B essential modifier-binding domain (NBD) ou l'ocytocine ont également été administré par voie IN (285). Le peptide NAP, composé de 8 acides aminés, a été administré chez un modèle murin de l'autisme et a même montré son efficacité au niveau de l'hippocampe et du cortex (287). Le peptide NBD quant à lui est composé de 22 acides aminés et a été retrouvé dans l'hippocampe d'un modèle de souris pour la MA après administration IN. Le peptide a pu limiter l'apoptose des

neurones de l'hippocampe, réduire la quantité d'A β et améliorer la mémoire et l'apprentissage spatiale des souris (286). Enfin, l'ocytocine est une hormone de 1 kDa qui a également été administrée par voie IN pour traiter l'autisme chez un modèle de souris. L'hormone a limité le stress de l'animal, suggérant l'efficacité pharmacologique de l'ocytocine administrée par voie IN (25). Les résultats de ces études suggèrent qu'à la fois la plus-value de l'administration IN mais également celle d'utiliser des NPs pour protéger le BP *in vivo*, doivent être étudiées.

Enfin, il faut également prendre en compte la pathologie traitée et l'âge auquel cette maladie survient. En effet, la BHE se détériore avec l'âge, tant sur le plan structurel qu'au niveau de mécanismes de transport, avec notamment la perte des JS. Ces modifications de transport peuvent permettre l'entrée de molécules plus grosses dans le cerveau comme par exemple l'albumine ou le fibrinogène. Avec l'âge, les péricytes déclinent, ce qui dégrade le flux sanguin et la fonction neuronale (288). Dans le contexte de la MA, la détérioration de la BHE est quasiment systématiquement associée à la maladie. Il a d'ailleurs été montré que l'Apolipoprotéine E4, impliquée dans la MA, est également impliquée dans la détérioration de la BHE (289). Il faudrait donc également étudier cet aspect de l'intérêt de la voie IN, qui est principalement de contourner la BHE, dans un contexte pathologique de détérioration de cette BHE. De plus, un des autres avantages majeurs de l'utilisation des NPs est la possibilité de les utiliser pour suivre le trajet du médicament en encapsulant des agents de contraste. La volonté de cibler les marqueurs de la maladie afin de les visualiser et de les traiter pourrait faire de ces NPs un outil théranostique pertinent.

CHAPITRE 4

Nanoparticules pour une approche combinée diagnostic-thérapeutique



Créée avec BioRender.com

Dans cette dernière partie de la thèse, le potentiel de nos nanoparticules (NPs) comme outil théranostique a été étudié. Ce terme, désigne la thérapie guidée par l'imagerie ou bien les principes actifs détectables par imagerie (290). En cancérologie, cette combinaison permettrait d'obtenir une stratégie de traitement optimisée : la partie diagnostique permettant de visualiser si le patient a encore besoin du traitement ou non. Le domaine théranostique est vaste et les deux principaux outils sont les radio-médicaments et les NPs. Ces outils sont particulièrement intéressants pour fournir une image en temps réel de la tumeur tout en administrant l'agent thérapeutique. Ils permettent également de visualiser en temps réel l'efficacité du traitement. Cela permet d'ajuster au mieux les doses de traitements administrées mais également, en cas de rémission, d'arrêter le traitement à l'instant où le cancer est traité (291).

I. Nanoparticules contrastantes et anticancéreuses

A. Les nanoparticules comme outils théranostiques contre les cancers

Les méthodes d'imagerie utilisées pour la détection des tumeurs et des métastases, manquent de sensibilité et de spécificité, ce qui entraîne une détection tardive et un potentiel de rémission réduit. De plus, la particularité des maladies très hétérogènes, comme les cancers, poussent les chercheurs et les médecins à personnaliser les traitements. Les chimiothérapies sont très toxiques et ont de nombreux effets secondaires. La combinaison d'un agent de diagnostic puissant avec un agent thérapeutique efficace et localisé semble être une solution potentielle (290). En effet, l'agent de diagnostic peut d'une part permettre de cibler le traitement et d'administrer la bonne dose au bon endroit mais d'autre part de visualiser en temps réel l'efficacité du traitement et l'éventuelle diminution de la taille de la tumeur.

L'utilisation des NPs comme outil théranostique est en plein essor, grâce à leur capacité de libération contrôlée des médicaments et leur capacité d'encapsulation de molécules thérapeutiques et d'agents d'imagerie. Différentes NPs ont été conçues dans ce but, notamment des NPs magnétiques pour l'imagerie à résonance magnétique (IRM) et associées à des agents thérapeutiques. Cependant, leur nature inorganique pose des questions en termes de toxicité et d'immunogénicité. Les NPs polymériques apparaissent une nouvelle fois comme un choix particulièrement pertinent pour leur biocompatibilité et leur adaptabilité (290). En effet ces NPs sont de parfaits candidats pour l'encapsulation de molécules thérapeutiques que l'on peut également associer à des agents d'imagerie. Par ailleurs, il est aussi possible de fonctionnaliser la surface de ces NPs pour ajouter par exemple

des agents de ciblage ou bien encore des molécules thérapeutiques (292) comme développé dans le chapitre 1.

B. L'hafnium comme agent de contraste pour l'imagerie aux rayons X

Une des méthodes d'imagerie utilisées pour diagnostiquer un cancer est l'utilisation de la tomodensitométrie (TDM). En effet, elle permet de caractériser les différents types de tissus dont les tissus mous et l'os. Cette technique, rapide et facile d'accès, est facilement utilisable en laboratoire pour des tests avec des petits animaux. La TDM possède également une très grande résolution spatiale. De plus, cette technique d'imagerie peut facilement être couplée à des techniques d'imagerie fonctionnelle comme la tomographie par émission de positons (TEP et TEP-TDM) (211).

L'agent de contraste le plus fréquemment utilisé en clinique est l'iode bien que cela ne soit pas l'élément le plus adapté aux rayons X et à la TDM en lien avec son coefficient d'atténuation. Dans les appareils actuels, les tubes ont une tension comprise entre 80 et 140 kV. Or, l'iode a une énergie spécifique de 33,2 keV qui est hors du spectre de tension du tube du tomographe (1 kV correspond de manière grossière à 1 keV). Cette énergie correspond à l'énergie nécessaire pour éjecter un électron de la couche K de l'atome. Compte tenu du spectre de tension des appareils modernes, il est particulièrement conseillé d'utiliser des éléments dont l'énergie spécifique est comprise entre 60 et 80 keV. L'hafnium a une énergie spécifique de 65,4 keV et est donc particulièrement adapté à la TDM (293).

De plus, l'iode actuellement utilisé en clinique possède une demi-vie assez courte, est particulièrement toxique pour les reins et peut être immunogène pour le patient. Les NPs et notamment les NPs polymériques peuvent encapsuler ces agents de contraste et empêchent leur élimination, permettant ainsi d'augmenter la demi-vie et d'éviter la réinjection, réduisant ainsi la toxicité rénale et l'immunogénicité (294). Par exemple, l'encapsulation de NPs d'or dans des NPs polymériques ont permis d'obtenir un agent de contraste puissant et biocompatible (295). L'hafnium, en plus d'être un agent de contraste puissant (293), a déjà été utilisé dans le contexte du cancer afin de potentialiser l'effet de la radiothérapie (296,297). Encapsulé dans des NPs polymériques, un nouvel agent de contraste efficace et biocompatible pourrait être développé.

C. Les cancers du cerveau

Les tumeurs cérébrales primaires représentent 20 % des décès par cancer chez les jeunes adultes et 30 % chez les enfants. Parmi les tumeurs cérébrales, les gliomes sont retrouvés dans 26 % des cas, et la moitié des gliomes sont des glioblastomes, qui sont des tumeurs cérébrales primaires malignes chez l'adulte avec un pronostic sévère (298). Les symptômes peuvent varier en fonction de la localisation de la tumeur (299).

Les tumeurs cérébrales peuvent être traitées par une combinaison de chirurgie et de radiothérapie et/ou de chimiothérapie administrée par voie intraveineuse (IV) (277). Mais l'un des inconvénients des agents de chimiothérapie actuels tels que le cisplatine ou la vincristine est qu'ils induisent également une mort des neurones sains (300).

Des traitements anticancéreux ont été développés dans des NPs pour cibler spécifiquement les gliomes. La camptothécine est un médicament anticancéreux commercialisé qui a été chargé dans des NP-PEG-PCL fonctionnalisées avec un peptide pénétrant dans les cellules (TAT). L'administration intranasale (IN) a été évaluée chez des rats atteints de gliomes et a produit un effet thérapeutique supérieur à celui du médicament libre (132). En ce qui concerne les traitements du glioblastome, différentes molécules approuvées ont été étudiées, comme le méthotrexate, qui a été chargé dans des NPs de PLA. Après administration IN chez le rat, il a été confirmé que les NPs étaient capables d'atteindre le cerveau (82). Le témozolomide a également été incorporé dans des NPs de PLGA enrobées de chitosane et a montré une efficacité antitumorale après administration IN chez le rat (76).

Ainsi, l'administration du nez au cerveau (ANC) apparaît encore une fois comme très avantageuse pour améliorer la biodisponibilité et l'efficacité des traitements, notamment contre les cancers du cerveau. L'utilisation des NPs polymériques comme vecteurs de ces médicaments pourraient améliorer la survie des patients.

D. De nouvelles molécules contre le glioblastome

La perhexiline (PH) est une molécule amphiphile connue depuis les années 70 qui était utilisée contre les angines, mais en raison d'une toxicité hépatique et neuronale importante elle n'est plus utilisée dans ce cadre. Cependant, aux doses limitant les effets secondaires, il a été montré que la PH pouvait avoir un effet toxique sur différentes lignées cellulaires issues de cancer. Cet effet antitumoral a été confirmé *in vivo* sur des modèles animaux notamment contre le cancer du sein, le glioblastome mais également les leucémies ou le cancer colorectal (301).

La sertraline (SERT) est un antidépresseur utilisé depuis 1992 contre les troubles majeurs de la dépression, l'anxiété et les troubles du comportement alimentaire. En étudiant plus en détail cette molécule hydrophile, ses propriétés anticancéreuses ont été mises en avant. Cette molécule a été évaluée contre différents types de cancers, notamment le cancer du poumon, le cancer colorectal ou le cancer du sein (302).

Ces molécules sont étudiées sur le glioblastome par l'équipe de la Dre. Erika Cosset, au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL) et nous les avons utilisées pour réaliser des NPs théranostiques. En effet, ces deux molécules utilisées en combinaison avaient déjà été utilisées par l'équipe pour traiter le glioblastome chez la souris, mais une administration de la dose efficace par voie IV provoquait le décès de l'ensemble des souris. L'utilisation combinée de NPs et de la voie IN pourrait réduire la toxicité systémique.

II. Des nanoparticules contenant de l'oxyde d'hafnium et des molécules anticancéreuses

A. Synthèse des nanoparticules avec de l'oxyde d'hafnium

Par l'intermédiaire d'une équipe de recherche du laboratoire de chimie de l'École Normale Supérieure (ENS) de Lyon, avec les Drs Olivier Maury, Frédéric Chaput et Frédéric Lerouge, nous avons pu obtenir des NPs d'oxyde d'hafnium (HfO_2).

L'hafnium obtenu est sous forme de NPs d' HfO_2 d'environ 5 nm de diamètre. Les NPs d' HfO_2 sont caractérisées par la diffusion dynamique de la lumière et de la microscopie électronique à balayage (Figure 56).

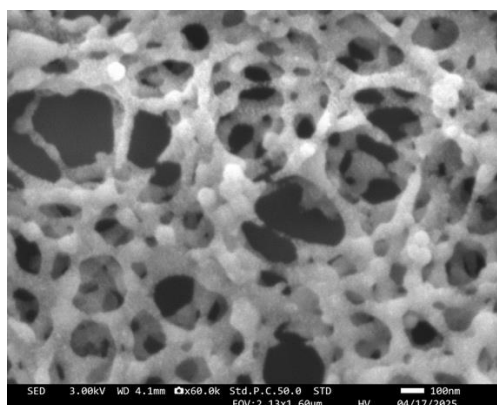


Figure 56 : Observation des NPs d' HfO_2 au microscope électronique à balayage ($n=1$)

Nous avons mis au point l'encapsulation des NPs d' HfO_2 dans les NP-PLA. Nous avons dû optimiser à nouveau la synthèse, la méthode utilisée précédemment ne fonctionnant pas et résultant en des NPs polymériques agrégées et qui précipitent au fond du tube.

Nous avons donc modifié certains paramètres comme la concentration en PLA dans la phase organique (20 mg/mL), la composition de la phase aqueuse (eau/éthanol) puis le ratio phase organique/phase aqueuse (1,5 v/v). Les NPs d'HfO₂ ont été dissoutes dans la phase organique pour avoir un taux de chargement à 2 %. Puis, la phase organique est précipitée dans la phase aqueuse et de l'eau est rajoutée en fin de coulée. Les solvants sont ensuite évaporés. La caractérisation nous donne un diamètre de 190,0 nm, un indice de polydispersité de 0,217 et une charge de surface de 43,5 mV. Par simplification, nous appellerons les NPs d'HfO₂ uniquement HfO₂.

B. Synthèses avec les molécules anticancéreuses et l'hafnium

En suivant la même méthodologie, nous avons rajouté les différentes molécules anticancéreuses dans nos NP-PLA contenant de l'HfO₂ (NP-HfO₂). Nous avons dilué chacune des molécules anti-cancéreuses dans la phase organique de la synthèse de manière à obtenir une dose thérapeutique pour la souris de PH (5 mg/kg) et de SERT (10 mg/kg), respectivement NP-HfO₂-PH et NP-HfO₂-SERT. Ces doses ont été déterminées par l'équipe de la Dre Cosset comme étant les doses efficaces pour traiter le glioblastome. Ce sont également les doses qui avaient été testées par l'équipe par voie IV. Nous avons utilisé dans un premier temps chaque molécule thérapeutique seule, puis une combinaison des deux (PH et SERT). Les NPs obtenues ont été caractérisées par la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et la mobilité électrophorétique comme expliqué précédemment.

Aucune différence significative n'a été mise en évidence lors de l'ajout de l'une, l'autre ou les deux molécules cancéreuses (Figure 57).

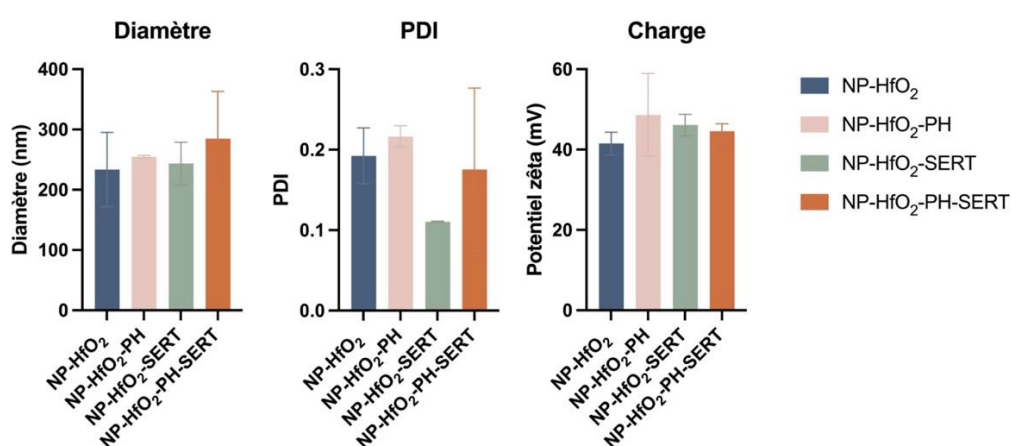


Figure 57 : Caractérisation par la DLS et par la mobilité électrophorétique des NPs contenant des NPs d'HfO₂ seules ou avec la PH, la SERT ou la combinaison des deux (n=2, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type)

En conclusion, notre méthode de synthèse permet la co-encapsulation d'HfO₂ mais également de molécules anticancéreuses dans les NP-PLA, ce qui nous laisse à penser que ces NPs pourraient faire un outil théranostique pertinent.

III. Évaluation *in vitro* et *in vivo*

A. Microscopie électronique à transmission

L'encapsulation de l'HfO₂ a été confirmée par microscopie électronique à transmission. Les images présentées dans la Figure 58 montrent des NPs rondes, souvent associées les unes aux autres d'un diamètre proche des 100 nm. L'HfO₂ est très majoritairement encapsulé dans les NPs, nous n'en détectons pas dans le surnageant des NPs. Ces résultats, obtenus pour un seul lot de NP-HfO₂, sont à répéter pour confirmer la qualité de la synthèse.

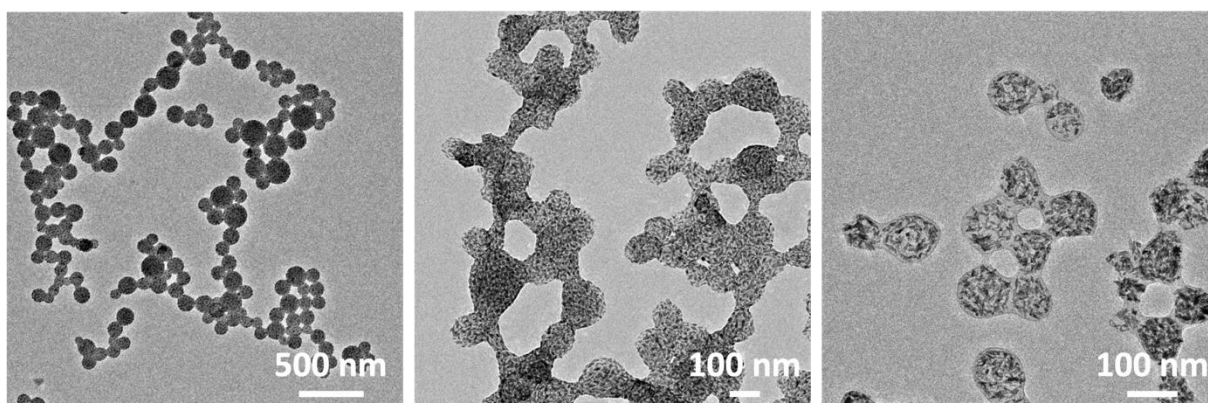


Figure 58 : Évaluation de l'encapsulation de l'HfO₂ dans les NP-PLA avec la microscopie électronique à transmission (n=1)

B. Tests sur les cellules

Nous avons ensuite évalué la viabilité des cellules RPMI 2650 comme expliqué dans les chapitres précédents grâce à la méthode du PrestoBlue™. Les NPs comme les NP-HfO₂ ne semblent pas impacter la viabilité des cellules épithéliales alors qu'en présence de molécules anticancéreuses, la viabilité des cellules est très faible (Figure 59). L'HfO₂ n'est pas toxique pour les RPMI 2650, mais la PH et la SERT le sont.

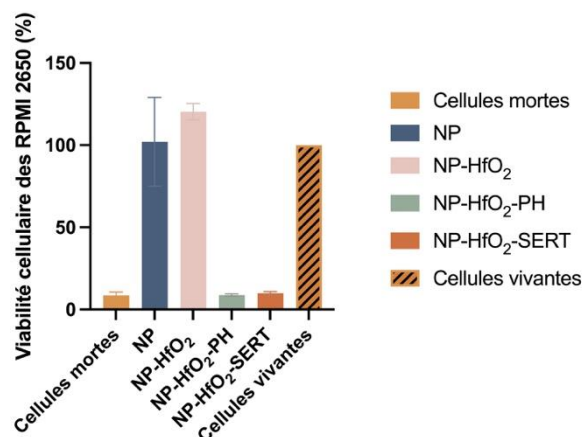


Figure 59 : Viabilité des cellules RPMI 2650 après 24 h de contact avec les NPs contenant de l'HfO₂ ainsi que de la PH, de la SERT ou à la fois de la PH et de la SERT (n=1)

C. Imagerie aux rayons X

Enfin, nous avons voulu vérifier que le potentiel contrastant de nos NP-HfO₂ était maintenu après une administration IN *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé dans un premier temps, un appareil à rayons X, dont la résolution est très importante, utilisé par d'autres membres de notre équipe, le Dr Laurent Viriot et Arthur Oulès. En effet, le tomographe à rayons X utilise des rayonnants de très haute énergie mais de ce fait, il ne permet pas de travailler sur des échantillons vivants. Nous avons donc, pour cette partie, travaillé sur des têtes de souris euthanasiées. L'appareil utilisé nous permet également de visualiser notre échantillon en 3D. Il est ensuite possible de faire des reconstructions à partir des images obtenues afin de se déplacer virtuellement dans l'échantillon. Ces traitements d'images permettent ainsi d'obtenir différents plans de coupes à tous les endroits désirés.

Cependant, l'utilisation de cet appareil demande la mise au point d'un protocole particulier afin de pouvoir observer les tissus qui nous intéressent. Tout d'abord, comme mentionné dans le chapitre 2 pour réaliser des coupes de cavités nasales, la première étape est la fixation des tissus. Dans un second temps, nous avons déminéralisé la tête des souris. Cette étape est cruciale pour l'observation des tissus aux rayons X. En effet, l'os est extrêmement absorbant aux rayons X, si un tissu minéralisé persistait, nous ne pourrions pas isoler le signal issu de l'os par rapport au signal généré par l'HfO₂. Puis nous avons déshydraté les têtes de souris, la présence d'eau pouvant perturber fortement la capture d'images et la netteté de ces dernières.

Nous avons donc évalué notre protocole de traitement des échantillons. Nous avons commencé par observer une souris naïve (Figure 60). Ici, la tête de la souris n'a pas été disséquée et nous ne l'avons pas déminéralisée. Cette observation nous permet dans un

premier de visualiser les structures osseuses de la tête de la souris ainsi que le cartilage présent dans les cornets.

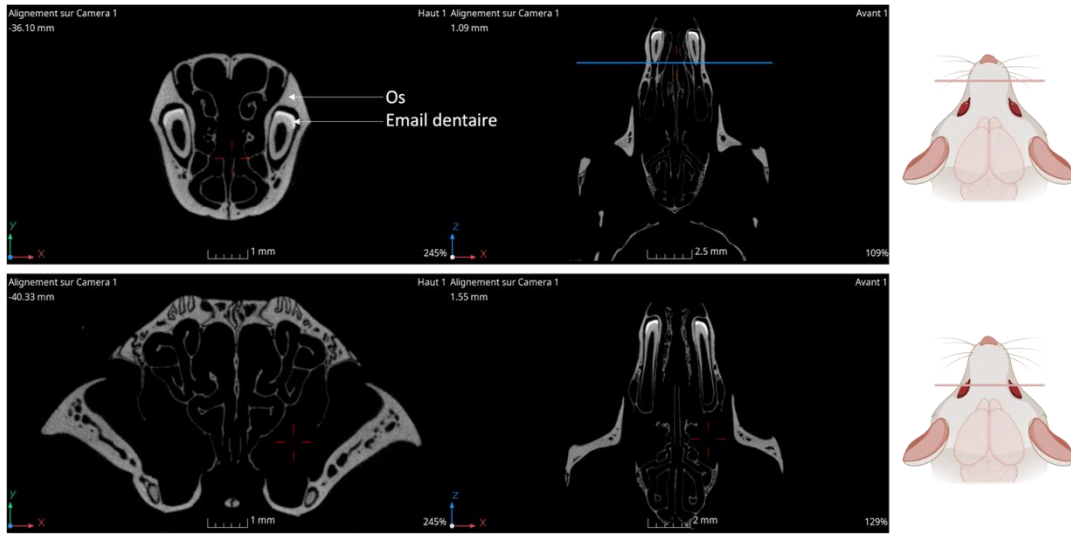


Figure 60 : Images au tomographe à rayons X d'une souris naïve sans traitement préalable (la tête a été récupérée et imagée), V : 100 kV, I : 70 μ A. A droite, les zones de section sont représentées sur un schéma de tête de souris.

Pour éliminer le signal lié à l'os, nous avons déminéralisé les têtes disséquées pendant 14 jours et visualisé dans quelles conditions l'os ne nous gênerait pas pour l'observation (Figure 61). Ainsi, lors des prochaines images que nous prendrons, nous serons sûrs que les zones très blanches correspondent à l'HfO₂ et non à l'os ou l'émail dentaire.

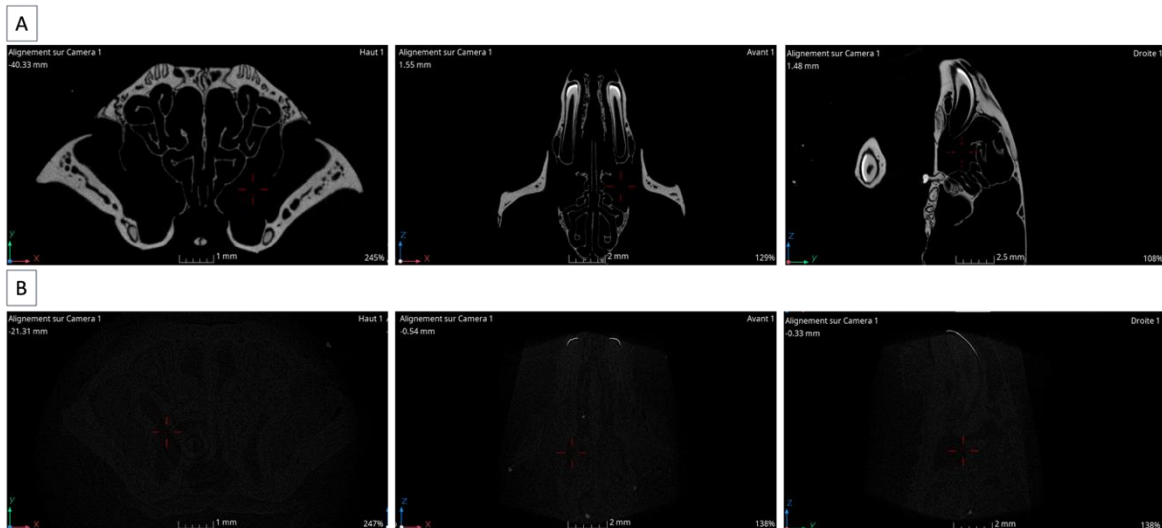


Figure 61 : Images au tomographe à rayons X d'une souris naïve non déminéralisée (A) ou déminéralisée pendant 14 jours (B)
V : 100 kV, I : 70 μ A

Enfin, l'absence de signal issu de l'os ne nous permet pas de nous repérer dans l'espace. Si le signal de l'HfO₂ était visible, nous ne pourrions pas identifier sa localisation avec certitude. Nous avons donc voulu visualiser les tissus mous grâce à une coloration à l'iode, permettant

de marquer légèrement ces tissus mous. Ces images nous permettent de visualiser l'entièreté des structures de la tête de la souris et notamment les cavités nasales avec tous les cornets (Figure 62).

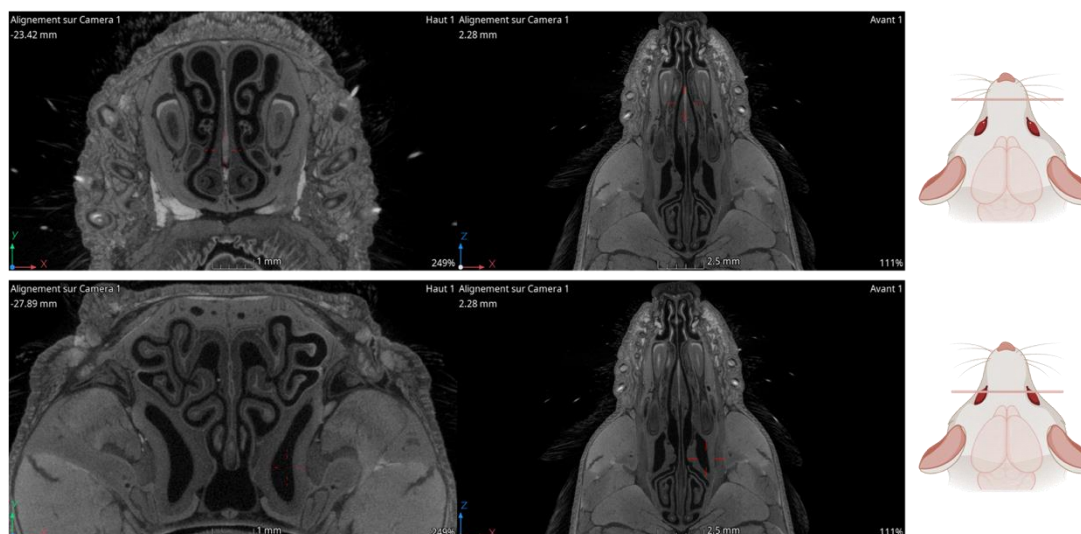


Figure 62 : Images au tomographe à rayons X d'une souris naïve sans traitement préalable (la tête a été récupérée et imagée telle quelle, sans dissection), après un marquage des tissus mous à l'iode V : 100 kV, I : 70 μ A. A droite, les zones de section sont représentées sur un schéma de tête de souris

Après avoir établi un protocole clair permettant d'isoler le signal issu de l' HfO_2 et de le localiser dans la tête de la souris, nous avons procédé à l'observation des têtes de souris après administration IN. Pour cela, nous avons d'abord administré les NP- HfO_2 par voie IN chez des souris femelles C57BL/6J. Trois heures après administration, les souris ont été euthanasiées et nous avons récupéré les têtes des souris comme décrit précédemment. Les têtes ont été fixées puis décalcifiées avant d'être déshydratées et observées au tomographe à rayons X. Les images (Figure 63) nous permettent de voir que les NP- HfO_2 ont tapissé en fine couche les cavités nasales de la souris. Nous observons un marquage plus présent du côté droit, ce qui nous montre que la première narine administrée reçoit donc plus de produit.

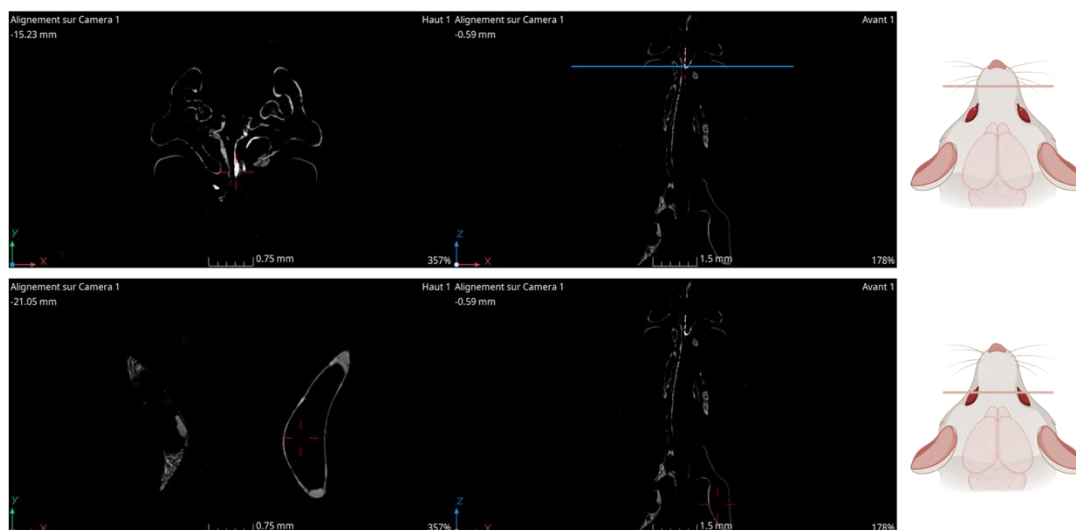


Figure 63 : Images au tomographe à rayons X d'une souris ayant reçu des NP-HfO₂ par voie IN. Les images ont été prises 3 h après l'administration
V : 100 kV, I : 70 μ A. A droite, les zones de section sont représentées sur un schéma de tête de souris

Nous avons à nouveau réalisé un traitement à l'iode pour mieux visualiser les structures de la cavité nasale et analyser plus précisément la localisation des NP-HfO₂. Nous observons le signal de l'HfO₂ de l'avant à l'arrière de la cavité nasale (Figure 64), du début des cornets en amont des narines jusqu'aux sinus maxillaires (ou glandes de Sténo). Sur les images en coupe sagittale, le bulbe olfactif est légèrement visible mais nous ne détectons pas de NP-HfO₂ dedans.

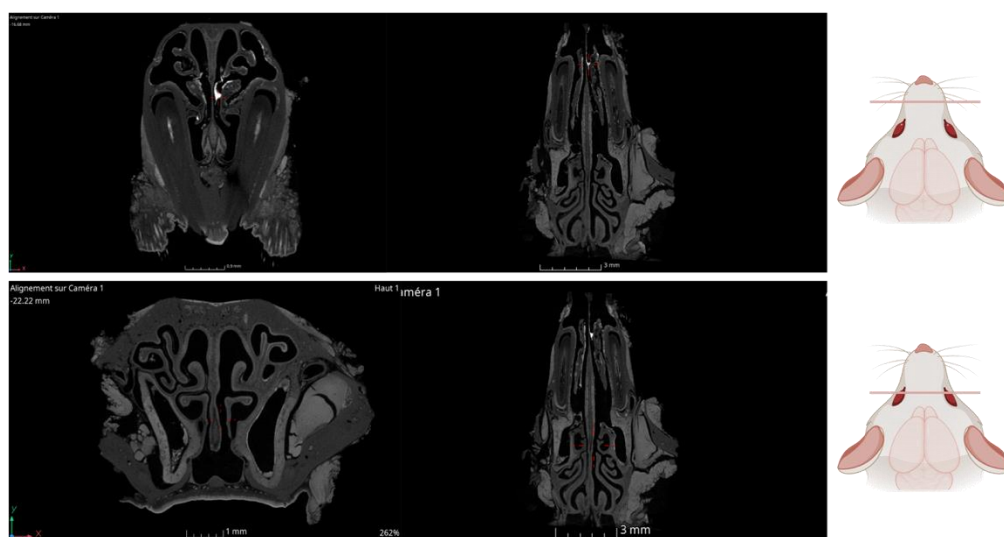


Figure 64 : Images au tomographe à rayons X d'une souris ayant reçu des NP-HfO₂ par voie IN. Les images ont été prises 3 h après l'administration. Après déminéralisation, la tête a été marquée avec de l'iode pour faire ressortir les tissus mous
V : 100 kV, I : 70 μ A. A droite, les zones de section sont représentées sur un schéma de tête de souris.

D. Évaluation de l'effet thérapeutique

Grâce à notre collaboration avec l'équipe de la Dre Erika Cosset, nous avons pu tester nos formulations chez des souris Nude. Ces souris sont utilisées comme modèle pour le glioblastome. Pour cela, des cellules cancéreuses souches issues de la biopsie du glioblastome d'un patient (Ge904) ont été modifiées avec la GFP-Luciférase afin de pouvoir les visualiser grâce à la bioluminescence. Sur la plateforme du petit animal du CRCL (P-Pac), les souris sont anesthésiées avec de la kétamine/xylazine par voie intrapéritonéale et reçoivent un analgésique (la buprénorphine) par voie sous-cutanée. Grâce à un appareil de stéréotaxie, une incision est faite de l'os occipital jusqu'à l'os frontal, puis l'injection des cellules se fait au niveau du bregma après avoir créé une sorte de poche pour les cellules par insertion puis retrait de l'aiguille. Lentement, 50 000 cellules sont injectées dans 2 μL de PBS 1X. La souris est ensuite suturée. Grâce à l'appareil de bioluminescence présent sur la plateforme, les tumeurs peuvent être visualisées après injection de luciférine. La taille des tumeurs est suivie et les souris sont traitées une fois la taille suffisante atteinte.

Un fois le modèle de souris établi, nos différentes formulations sont administrées par voie IN comme décrit dans le chapitre 2. Les souris traitées reçoivent 10 μL de NP-HfO₂-PH dans chaque narine, deux fois de suite, soit 10 μL de NP-HfO₂-SERT dans chaque narine, deux fois de suite, soit 10 μL de NP-HfO₂-PH-SERT dans chaque narine, deux fois de suite, ou bien 10 μL de NP-HfO₂-PH dans chaque narine puis 10 μL de NP-HfO₂-SERT par narine. Les souris contrôles reçoivent, elles, deux fois 10 μL de NP-HfO₂ par narine. Ces 40 μL de NP-HfO₂ avec ou sans traitement sont administrés deux fois par semaine pendant 15 jours puis une fois par semaine par la suite, jusqu'à l'atteinte des points limites de l'étude. L'évolution de la tumeur est suivie par bioluminescence et l'état général de la souris est suivi par le poids, les crises d'épilepsie ou la prostration de l'animal. Si la souris atteint un point limite (taille de la tumeur, perte de poids, crises d'épilepsie, état général détérioré), elle sera mise à mort.

Les souris ayant reçu la formulation avec les molécules anticancéreuses ne semblent pas développer des tumeurs aussi rapidement et aussi grosses que les souris qui ont reçu la formulation contrôle (Figure 65). Une différence significative en termes de survie des souris a pu être observée, montrant que les NP-HfO₂-SERT permettent de limiter très significativement la mortalité liée au glioblastome, qu'elles soient administrées seules, ou en combinaison avec la PH. Cette expérience sera reproduite afin d'évaluer l'efficacité du traitement sur un plus grand nombre d'individus et d'obtenir des résultats plus robustes.

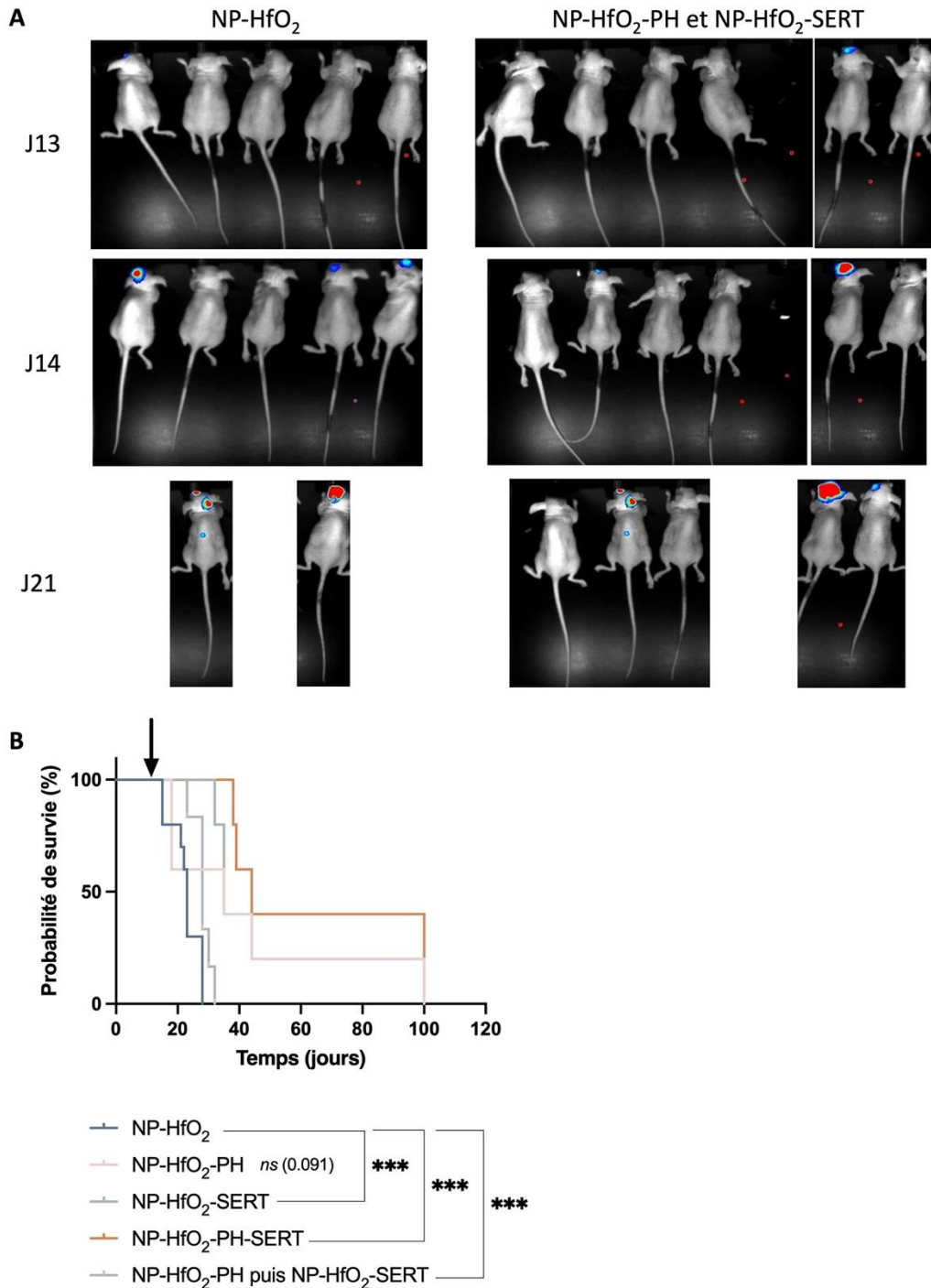


Figure 65 : (A) Images en bioluminescence pour le suivi de la taille des tumeurs. (B) Courbe de survie des souris à partir du jour de l'administration IN.

La flèche indique le premier jour de traitement ($n=10$ pour les NP-HfO₂, $n=6$ pour les NP-HfO₂-PH et NP-HfO₂-SERT et $n=5$ pour les autres groupes, test de survie de Log-rank (Mantel-Cox))

En conclusion, les NP-HfO₂-PH et les NP-HfO₂-SERT semblent avoir une activité thérapeutique au niveau du cerveau sur le développement tumoral mais également sur la survie des souris, avec un effet très important des NP-HfO₂-SERT. Cela renforce les espoirs sur les capacités des NPs polymériques à accéder et à avoir une action thérapeutique au niveau cérébral bien que d'autres expériences soient nécessaires à ce stade.

IV. Discussion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons étudié le développement d'un outil théranostique grâce à la co-encapsulation des molécules anticancéreuses et d'un agent de contraste nanoparticulaire pour les rayons X, l'HfO₂.

En optimisant la synthèse des NPs, nous avons pu obtenir des NPs dont la taille était inférieure à 200 nm. Leur charge était positive, l'HfO₂ étant sous forme nanoparticulaire et oxydée avec quatre charges positives, il n'était donc pas surprenant que la charge de la NP change. Cela supporte l'hypothèse selon laquelle l'HfO₂ se retrouverait en surface de la NP polymérique. L'ajout d'HfO₂ n'a pas modifié la morphologie des NP-PLA observées en microscopie électronique et l'HfO₂ est quasiment totalement encapsulé dans nos NPs. Une analyse complémentaire avec la technique de l'EDX (spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie) pourrait nous donner des informations plus précises sur la localisation de l'HfO₂ dans la NP, dans le cœur de la NP ou plutôt en surface.

Nous avons ensuite utilisé ces NPs contenant de l'HfO₂ pour encapsuler une ou plusieurs molécules anticancéreuses, la PH et la SERT. Cette encapsulation n'a pas non plus modifié les caractéristiques des NPs.

Par la suite, nous avons évalué la viabilité des cellules RPMI 2650 en présence des NPs contenant ou non de l'HfO₂, de la PH et de la SERT. Nous avons pu conclure que l'HfO₂ n'impactait pas la viabilité des cellules RPMI 2650, ce qui n'est pas le cas des molécules anticancéreuses. Cet impact des molécules anticancéreuses peut s'expliquer par l'origine tumorale des cellules RPMI 2650, il serait donc essentiel de tester les formulations sur des cellules non tumorales afin de vérifier l'impact des molécules anticancéreuses sur les cellules saines (303).

La TDM nous a permis de visualiser les structures de la tête de la souris ainsi que les NP-HfO₂. Nous avons observé que les NP-HfO₂ tapissaient la cavité nasale après l'administration IN. Malgré leur validation en tant qu'agent de contraste, nous n'avons pas visualisé les NP-HfO₂ dans le bulbe olfactif des souris. La TDM est une modalité d'imagerie très pertinente de par sa très haute résolution, cependant, la sensibilité reste limitée, ce qui pourrait expliquer l'absence de détection des NPs dans le bulbe olfactif, ces dernières étant plus diffuses. Il pourrait être intéressant d'imager le cerveau seul après un traitement à l'iode afin d'augmenter la sensibilité et donc d'éventuellement discerner les NP-HfO₂ dans le cerveau des souris. De plus, dans un contexte de traitement des cancers du cerveau, une accumulation au niveau de la tumeur pourrait permettre de visualiser les NPs spécifiquement au niveau de la zone d'intérêt et de pouvoir évaluer en temps réel la taille de la tumeur (304).

Enfin, les NPs ont été étudiées chez un modèle de souris présentant un glioblastome. Nous avons administré ces NPs par voie IN et observé l'évolution de la taille de la tumeur chez les animaux, ainsi que leur survie. Les résultats montrent que la survie des souris est plus importante lorsqu'elles reçoivent les NP-HfO₂-SERT que sans les molécules anticancéreuses.

Les résultats de ce chapitre nous ont permis de valider nos NPs comme outil théranostique contre le glioblastome. Cependant, la validation de la formulation ne peut pas se faire dans la caractérisation de l'encapsulation du médicament dans la NP. Pour cela, il semble plus qu'essentiel de développer une méthode de dosage par HPLC qui soit rapide et efficace.

Nous aurions pu fonctionnaliser la surface de nos NPs pour cibler directement les tumeurs du cerveau. Différentes stratégies existent comme l'ajout de molécules de ciblage. La glycoprotéine 29 du virus de la rage (RVG29), mentionnée dans le chapitre 1, a d'ailleurs déjà été utilisée. En effet, ce peptide est capable de se lier au récepteur nicotinique de l'acétylcholine et donc d'entrer dans les neurones (305). Une équipe de chercheurs a conjugué de manière covalente le RVG29 et le PEG-PLGA pour ensuite encapsuler le docétaxel, une molécule anticancéreuse déjà commercialisée. Le traitement a ensuite été injecté par voie IV chez des rats ayant un gliome. Les rats ayant reçu le traitement ont survécu plus longtemps que les rats contrôles, démontrant une bonne activité anticancéreuse de la formulation (306). Ainsi, cela nous laisse à penser que ce ciblage grâce au peptide RVG29 ainsi que l'utilisation de la voie nasale pourrait améliorer les traitements de manière encore plus efficace et de limiter au maximum les effets indésirables systémiques qui peuvent se produire par la voie IV.

Enfin, l'ajout de poloxamère dans la synthèse de nos NPs permettrait d'améliorer la stabilité des NPs dans les milieux biologiques et ainsi permettre à une plus grande quantité de NPs d'atteindre le cerveau comme démontré dans le chapitre 2.

DISCUSSION GENERALE

I. Résumé des résultats obtenus

Les maladies du cerveau restent un enjeu majeur de santé publique notamment à cause des difficultés d'identifier des cibles thérapeutiques pertinentes. Plusieurs raisons peuvent expliquer cela, en particulier le fait que les mécanismes pathologiques sont encore mal compris et d'autre part, la complexité intrinsèque de cet organe limite souvent l'efficacité des approches thérapeutiques conventionnelles. En effet, cette efficacité est réduite par les différentes barrières biologiques entre le site d'administration (orale ou intraveineuse) et le cerveau. La muqueuse intestinale, le métabolisme du foie mais surtout la barrière hématoencéphalique réduisent l'accès cérébral des traitements. L'administration intranasale (IN) est une approche particulièrement intéressante car elle utilise l'accès direct qui existe entre la cavité nasale et le cerveau grâce à la présence d'un neuroépithélium. Les limites que présentent l'administration IN, telles que la présence de mucus, la clairance mucociliaire ou encore les enzymes de dégradation, peuvent être surmontées par l'utilisation des nanoparticules (NPs) et notamment des NPs polymériques.

Dans ce projet, la première partie du travail portait sur la conception et l'optimisation de NPs à base d'acide polylactique (PLA) et de poloxamère (P188 ou P407) pour qu'elles correspondent aux prérequis pour une administration du nez au cerveau (ANC), c'est-à-dire des NPs avec un diamètre autour de 100 nm et de charge négative. Ces NPs ont été synthétisées de deux manières différentes pour évaluer la différence possible entre des NPs composées de manière homogène du PLA et du poloxamère ou bien des NPs de PLA recouvertes d'une couche de poloxamères. Nous avons ainsi obtenu cinq formulations différentes dont les caractéristiques physicochimiques ont montré qu'elles pourraient être utilisées pour l'ANC. Nous avons évalué ces NPs au contact de différents milieux biologiques et nous avons remarqué que les poloxamères permettaient de stabiliser nos NPs dans ces conditions par comparaison avec les NPs composées uniquement de PLA. Nous avons utilisé une méthode de modélisation informatique pour comparer nos deux méthodes de synthèse et cette simulation *in silico* a confirmé l'absence de différence déjà établie au niveau physicochimique. Les tests cellulaires n'ont par la suite révélé aucun frein à l'utilisation des formulations optimisées pour l'ANC puisqu'aucune toxicité n'a été observée quelle que soit la formulation utilisée. Enfin, l'évaluation chez la souris a permis de montrer que l'administration IN permettait bien aux NPs d'accéder au bulbe olfactif puis au cerveau grâce à l'imagerie par fluorescence. Les résultats ont été confirmés à une plus petite échelle grâce à la microscopie par fluorescence. L'analyse plus détaillée de NPs dans l'organe seul nous a permis d'établir qu'une des formulations semblait plus pertinente que les autres : les NP-PLA-P188.

La suite du projet a donc été l'évaluation de cette formulation comme plateforme pour l'ANC. Dans un premier temps, grâce à une collaboration avec le laboratoire MeLis, nous avons vectorisé un peptide (BP), dérivé du VEGF, capable de limiter l'agrégation des protéines A β en oligomères toxiques responsables de la maladie d'Alzheimer (MA). Dans un premier temps, ce travail a consisté à déterminer les meilleures conditions pour l'adsorption du peptide. La formulation ainsi obtenue (NP-PLA-P188-BP) a donc pu être évaluée et nous avons démontré la conservation de l'activité anti-amyloïde du BP une fois adsorbé à la surface des NPs. Nous avons pu également montrer que les NPs protégeaient le BP de sa dégradation dans un milieu biologique. De plus, la formulation n'avait aucun impact sur la viabilité des cellules. Enfin, les tests *in vivo* ont montré la localisation des NP-PLA-P188-BP au niveau du bulbe olfactif et du cerveau après une administration IN. Une évaluation de l'activité du BP sur un modèle murin de la MA pourrait compléter ces résultats et fournir des informations sur la fonctionnalité des NPs. L'utilisation d'un modèle de souris APP/PS1 qui présente des dépôts de la protéine A β , caractéristiques de la MA, et des tests comportementaux pour mesurer l'évolution de la mémoire des souris au cours du temps permettrait d'apprécier l'efficacité de cette formulation.

Enfin, nous avons évalué l'effet théranostique de nos NPs. Pour cela, nous avons collaboré avec le Laboratoire de Chimie de l'ENS pour obtenir un agent de contraste, des NPs d'oxyde d'hafnium (HfO₂) et avec le CRCL pour obtenir des molécules anticancéreuses. Nous avons donc encapsulé dans un premier temps l'HfO₂ dans les NP-PLA, nous avons vérifié l'encapsulation de l'HfO₂ dans les NP-PLA (NP-HfO₂) avec la microscopie électronique et nous avons confirmé le pouvoir contrastant de ces NP-HfO₂ grâce à la tomographie par rayons X qui nous a permis de visualiser les NPs dans la cavité nasale de la souris. Nous avons, dans un second temps, encapsulé également un médicament anticancéreux dans les NP-HfO₂ puis nous avons caractérisé cette formulation *in vitro* sur les cellules RPMI 2650 puis *in vivo*, pour évaluer leur potentiel thérapeutique chez des souris atteintes de glioblastome. Nous avons donc pu montrer leur efficacité pour limiter la croissance de la tumeur et améliorer la survie des animaux.

Malgré des résultats très prometteurs sur le potentiel à la fois thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer et théranostique contre le glioblastome, après une ANC, de nombreuses questions restent en suspens. Nous savons que les NPs sont capables d'atteindre le cerveau via le bulbe olfactif et qu'elles sont capables d'avoir une activité thérapeutique. Cependant, nous avons pu constater que des modifications des formulations étaient nécessaires pour transposer les NPs d'une application à une autre. De plus, les détails de leur transport de la cavité nasale au cerveau sont encore à déterminer, pour savoir si elles passent préférentiellement par les neurones olfactifs ou par une autre voie. D'autre part, nos

différentes évaluations nous ont permis de voir que l'évaluation *in vitro* était complexe, et parfois non transposable à ce qu'il se passe *in vivo*. Nous avons aussi constaté que l'évaluation *in vivo* présentait de nombreuses limites qui pouvaient conduire à des difficultés à passer de l'évaluation préclinique à l'évaluation clinique.

II. Formulation universelle ciblée : une idée utopique

Dans ce projet de thèse, l'objectif était de développer une plateforme universelle de délivrance de médicaments ou d'agents de contraste pour l'ANC. Or, comme montré dans le chapitre 1, à l'heure actuelle, aucun consensus sur le type de NPs n'a été établi, ni sur leur composition, ni sur leurs caractéristiques physicochimiques, ni même sur les méthodes utilisées pour les évaluer *in vitro* ou *in vivo*.

Les NPs polymériques, lipidiques ou inorganiques sont utilisées pour une ANC et leurs avantages respectifs ont été démontrés (44). En ce qui concerne plus particulièrement les NPs polymériques, il semble très compliqué de choisir de façon unanime un polymère composant les NPs ; d'une part les polymères présentent des avantages et des inconvénients qui leur sont propres (facilité de synthèse, taille, charge...) et d'autre part, les modifications de surface peuvent être très diverses. Ce dernier paramètre peut fortement impacter les propriétés intrinsèques des NPs. De fait, il est parfois complexe de déterminer les paramètres responsables du passage du nez au cerveau, les modifications de surface pouvant entraîner des changements au niveau d'autres paramètres physicochimiques. Les propriétés des NPs et leurs modifications de surface vont également avoir un rôle majeur sur leur prise en charge par les cellules. Des projets d'évaluation de la corrélation entre les propriétés physicochimiques et le transport muqueux sont d'ailleurs en cours dans l'équipe.

Il est important de prendre en compte l'effet de l'ajout d'un principe actif ou d'un agent de contraste sur les NPs. La diversité de ces molécules ne permet pas de prédire avec certitude les modifications que ces derniers vont impliquer sur les caractéristiques des NPs. Chaque modification de nos NPs peut entraîner des modifications physicochimiques qui peuvent se répercuter à la fois *in vitro* et *in vivo*. Dans le cadre de ce projet, l'adsorption du BP sur les NP-PLA n'a pas fonctionné tandis que cette dernière était possible avec les NPs composées de PLA et de P188. Aussi, l'encapsulation de NPs d'HfO₂ a été possible dans les NP-PLA, tandis que celle-ci n'était pas possible avec NP-PLA-P188. Ces nombreuses différences entre chaque formulation montrent la complexité d'établir une formulation unique adaptée à toutes les applications. Cependant, quelle que soit la composition des NPs, il a fréquemment été démontré que l'utilisation de NPs via une ANC a permis d'améliorer la biodistribution et souvent l'efficacité du traitement (76,126).

La formulation des NPs pour l'ANC reste un enjeu majeur, le but ultime étant d'obtenir une formulation stable permettant l'administration d'une dose thérapeutique suffisante au niveau de la cible du médicament. Cependant, il semble primordial de mieux comprendre les mécanismes de passage du nez au cerveau afin de trouver des cibles moléculaires permettant de diriger les NPs vers un type cellulaire particulier, comme les neurones olfactifs, mais également de comprendre comment ces NPs peuvent se déplacer au sein de la cellule pour passer de la cavité nasale au bulbe olfactif puis au cerveau.

III. Mécanismes de passage du nez au cerveau

Comme mentionné précédemment, différentes voies permettent d'accéder au cerveau depuis la cavité nasale : la voie olfactive via l'épithélium olfactif, la voie trigéminal via l'épithélium respiratoire et le nerf trijumeau et enfin la voie indirecte, le médicament passant ainsi dans la circulation sanguine via le réseau capillaire de la muqueuse nasale (307). Malgré une description déjà établie de ces différentes voies de passage, la prévalence d'une voie sur une autre, ou bien le fonctionnement approfondi de chaque voie reste encore assez méconnu (1).

La grande majorité des études sur l'ANC se focalise sur l'amélioration des formulations pour administrer des médicaments au cerveau, mais très peu d'études portent sur le chemin précis emprunté par les médicaments ou bien sur le devenir des médicaments une fois qu'ils arrivent au cerveau. En effet, le cerveau étant un organe des plus essentiels et très complexe, la localisation des formulations, les voies de transport empruntées ainsi que la potentielle toxicité sur l'organe sont essentielles à élucider avant d'envisager une utilisation chez l'humain et à plus grande échelle (1).

Les voies de passage pourraient être mieux comprises grâce aux expérimentations *in vivo* et en particulier grâce aux techniques d'imagerie. En effet, certains agents d'imagerie ne modifient pas les caractéristiques des NPs et permettent donc de visualiser la prise en charge réelle des NPs dans le corps. Après administration d'une molécule ou de NPs encapsulant un agent d'imagerie, la dissection de la muqueuse olfactive et l'utilisation de microscope de très haute résolution pourraient permettre de visualiser le cheminement au sein même des cellules. Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons pu visualiser les NPs de manière très large, dans le corps entier des souris ou bien très précise grâce à la microscopie confocale. Cependant, malgré la puissance de la microscopie confocale, il est difficile de distinguer les cellules et donc la localisation précise des NPs au niveau cellulaire. Des techniques d'imagerie comme de la microscopie électronique à transmission ou à balayage pourraient permettre

d'observer les NP-HfO₂ directement dans les cellules. Des études ont été faites en utilisant cette technique pour d'autres questions scientifiques notamment autour du SARS-CoV-2 (308).

Bien que ces techniques d'imagerie permettraient probablement de visualiser les NPs au sein même des cellules de l'épithélium olfactif, la compréhension des mécanismes de l'ANC repose également sur l'existence d'un modèle épithélial proche de ce qu'il se passe *in vivo*. Pourtant, aucun modèle cellulaire ne semble suffisamment pertinent et prédictif.

Un autre intérêt majeur de l'utilisation des NPs en plus de la protection contre la dégradation du principe actif est la possibilité d'apporter ce principe actif directement dans la zone d'intérêt. Pour cela, le ciblage des neurones olfactifs permettrait d'améliorer encore plus la délivrance du médicament au cerveau. Cependant, le mécanisme d'entrée dans les neurones est complexe et peu connu à l'heure actuelle. L'utilisation de ligands spécifiques des neurones olfactifs pourrait permettre de cibler ce transport neuronal afin d'améliorer l'action du traitement. Comme mentionné dans le chapitre 1, les récepteurs à la transferrine sont souvent retrouvés dans le système nerveux, ils peuvent donc être une voie de ciblage (309,310). Cependant, il n'est pas mentionné si ces récepteurs sont exprimés par les neurones olfactifs. En résumé, le ciblage des neurones est particulièrement complexe du fait de l'absence de récepteurs spécifiques et il est difficile de montrer que ce ciblage a bien eu lieu sans utiliser une méthode d'imagerie très précise comme la microscopie électronique pour montrer la localisation exacte des NPs dans les cellules.

IV. Évaluation *in vitro* complexe

L'évaluation des formulations pour l'ANC est complexe. En effet, le modèle le plus utilisé est basé sur les cellules RPMI 2650 qui sont des cellules de l'épithélium nasal humain. Ce type cellulaire permet d'étudier l'absorption du médicament, sa toxicité et sa perméabilité. Cependant, sa différenciation est limitée et certaines fonctions physiologiques sont absentes, notamment la production de mucus, principale barrière de l'ANC et donc enjeu majeur de la caractérisation des formulations (311). Malgré leur utilisation en culture air-liquide permettant la culture d'une barrière épithéliale proche de la muqueuse, ce modèle cellulaire, ici monotypique, reste tout de même très éloigné de l'anatomie de la muqueuse olfactive (312). De plus, malgré une utilisation importante de ce modèle, les conditions de culture diffèrent souvent, générant des résultats différents (312). Une culture monocellulaire est donc un modèle très éloigné des conditions *in vivo*. Une certaine uniformité des conditions de culture et des méthodes d'évaluation des formulations permettrait de mieux comparer les formulations entre elles mais également les différentes études entre elles. Dans notre projet, nous avons cultivé les cellules RPMI 2650 à l'interface air-liquide et nous avons obtenu un

épithélium composé de plusieurs couches de cellules qui ne sécrétait pas de mucus, à nouveau très différent de l'épithélium pseudostratifié de la muqueuse olfactive. Nous sommes donc passés d'une étude sur deux types cellulaires différents, l'un issu de cellules humaines, les RPMI 2650, l'autre de cellules de rat, les PC12, à directement une étude *in vivo* avec des souris, faute de modèles d'étude intermédiaires faciles d'accès. Ces deux types cellulaires représentent les deux types cellulaires majoritaires dans la muqueuse olfactive. Une coculture semble difficilement envisageable à cause de la nécessité de différencier les PC12 dans un milieu de culture spécifique mais également au vu de l'origine différente des deux types cellulaires.

Des modèles à base de cellules plus innovants commencent à être développés et pourraient être envisagés dans le cadre de notre étude. Les organoïdes sont un modèle intéressant, comme mentionné dans le chapitre 1, permettant de recréer un tissu complexe à partir d'échantillons animaux. Cependant, concernant l'épithélium olfactif, la culture de tels organoïdes est encore aux prémices de son développement. En effet, moins d'une dizaine d'articles mentionnent des organoïdes de l'épithélium olfactif. Ce faible nombre d'études s'explique d'une part à cause des difficultés concernant le prélèvement de cet épithélium olfactif et d'autre part la difficulté de distinguer l'épithélium respiratoire et l'épithélium olfactif, les deux étant proches anatomiquement et physiologiquement. Seul un marquage des cellules neuronales pourrait les différencier *a posteriori*. De plus, dans l'hypothèse où les organoïdes pourraient être cultivés et isolés des autres tissus, il faudrait pouvoir tester nos formulations sur ce modèle. Ces tests pourraient se baser sur des tests similaires à ceux de l'étude des cellules en deux dimensions (viabilité et cytotoxicité, immunohistochimie pour la pénétration dans les cellules). Il est également à noter que lors de la culture des organoïdes, la lumière de la cavité nasale se trouve au centre de l'organoïde, il faudrait donc inverser la polarité afin de pouvoir administrer les formulations du côté apical des cellules et non du côté basal. Il est aussi envisageable d'utiliser la micro-injection, ou bien d'ouvrir l'organoïde et l'aplanir sur un insert de culture afin de modéliser le passage de la formulation de part et d'autre de cet épithélium. Ce modèle pluricellulaire, plus complexe que nos cultures cellulaires actuelles, devrait permettre d'améliorer l'analyse des formulations mais les techniques utilisées restent relativement similaires à l'étude des cellules en culture 2D.

Il est aussi intéressant de comparer l'ANC avec d'autres administrations au niveau d'autres épithéliums tels que la peau, la muqueuse intestinale ou encore la muqueuse buccale. Tout d'abord, la différence de surface entre ces épithéliums est importante. Chez l'humain, la peau ou la muqueuse intestinale ont une très grande surface d'administration (313), la muqueuse buccale mesure autour de 200 cm² (314), ce qui est encore très largement

supérieur à la surface de la muqueuse olfactive qui est d'environ 8 cm² (21). De plus, des modèles *ex vivo* humains peuvent exister pour la peau ou l'intestin, souvent issus d'opérations chirurgicales. Ce type de modèle est quasiment inexistant pour l'épithélium olfactif chez l'humain, la résection de l'épithélium olfactif n'étant pas largement réalisée car elle priverait le patient de l'odorat. Il semblerait tout de même qu'une très petite partie de l'épithélium olfactif soit présente sur les cornets de la cavité nasale qui pourraient être récupérés lors de chirurgie mais ces modèles ne sont pas non plus décrits dans la littérature.

Enfin, un facteur qui n'est quasiment jamais pris en compte lors de l'étude de formulation pour une ANC est l'immunité locale. Cette immunité, très largement présente dans l'épithélium respiratoire *in vivo*, n'est absolument pas présente dans les modèles *in vitro* les plus complexes (épithéliums reconstruits, organoïdes). Il semble donc important de vérifier l'immunogénicité de notre formulation qui, si elle est détectée par le système immunitaire, sera très certainement éliminée. En effet, la cavité nasale étant le premier point d'entrée de l'air dans le corps et donc des pathogènes qu'il contient, le système immunitaire muqueux y est très développé. Des cellules à la fois de l'immunité innée, telles que les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages, et de l'immunité adaptative, les lymphocytes T, sont présents dans la muqueuse olfactive (315). De plus, des tissus lymphoïdes sont localisés à proximité de la cavité nasale, notamment les amygdales, contenant les cellules immunitaires nécessaires comme les cellules présentatrices d'antigènes, mais également des lymphocytes T et B. Des cellules immunitaires sont également directement présentes dans l'épithélium respiratoire comme les cellules M, en particulier au niveau du tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale (NALT). Ce système immunitaire étant très développé, la vaccination par la voie nasale est de plus en plus étudiée (316).

V. Limites de l'administration *in vivo*

En ce qui concerne l'administration *in vivo*, une nouvelle fois, même si le modèle de souris ou de rat est très largement étudié pour l'ANC, un manque de consensus sur la méthode d'administration, le volume d'administration ainsi que l'anesthésie persiste. Cette lacune limite une nouvelle fois la comparaison entre les études et même parfois la reproduction des résultats (317). Par exemple, dans le cadre de notre étude, nous avons choisi d'administrer 10 µL de formulation par narine, ce qui est différent de ce qu'ont fait Musumeci *et al*, qui ont administré un volume de 200 µL par souris (77).

De plus, les techniques d'imagerie *in vivo* actuelles présentent une résolution spatiale limitée ou bien ne pénètrent pas suffisamment bien dans les tissus pour permettre un suivi précis de la distribution du médicament après une administration IN. En effet, actuellement,

chaque technique a ses avantages et ses inconvénients et c'est souvent une combinaison de plusieurs techniques différentes qui permet d'obtenir une vue d'ensemble de ce qu'il se passe *in vivo*. En effet, comme nous avons pu le voir dans le chapitre 2 et dans le chapitre 3, l'imagerie optique utilisant des fluorochromes est essentielle pour visualiser ce qu'il se passe au niveau cellulaire mais sa faible pénétration dans les tissus limite son utilisation *in vivo* chez la souris et la rend quasiment impossible chez l'humain (318). De plus, des limites techniques nous poussent à utiliser différents fluorochromes pour différentes expériences donc différentes formulations. La tomodensitométrie permet de visualiser l'anatomie avec énormément de détails mais ne nous fournit pas d'information au niveau cellulaire (318). Ainsi la multiplication des modalités d'imagerie, donc des agents de contraste, donc des formulations, peut entraîner un biais d'interprétation. En effet, dans notre étude, les NP-HfO₂ n'ont pas du tout les mêmes caractéristiques physicochimiques que les NPs contenant le fluorochrome, les résultats ne sont donc pas comparables entre les deux types de formulations. La nécessité de développer des outils d'imagerie puissants, non invasifs ainsi que de nouveaux agents de contraste apparaît comme un élément primordial dans la compréhension et l'évaluation de l'ANC.

La combinaison de plusieurs agents d'imagerie comme un fluorochrome et un agent pour les rayons X permettrait de coupler les deux modalités d'imagerie afin de tirer profit de chacun de leurs avantages. L'utilisation d'appareil multi agents pourrait également permettre d'obtenir plusieurs informations en une seule fois. Aujourd'hui, les méthodes d'imagerie largement utilisée chez l'humain restent l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et notamment l'IRM fonctionnelle (319) ou l'IRM utilisant des champs magnétiques ultra-hauts (7 T). Cette dernière technique permet d'obtenir un meilleur ratio signal/bruit de fond, ce qui permet également d'améliorer la résolution et la taille du voxel (320).

VI. Problématique de la translation clinique

Enfin, le dernier point à soulever reste le passage d'un modèle animal à l'humain. Comme mentionné dans le chapitre 1, des différences anatomiques majeures existent entre la cavité nasale murine et humaine (194). De plus, il existe des variabilités interindividuelles chez l'humain. Dans une étude de Maréchal *et al* (321), de nombreuses différences anatomiques des cavités nasales ont été montrées entre différentes populations, notamment liées aux différences climatiques mais également à l'âge. L'étude a également démontré une forte différence entre les deux hémicavités. Même si ces informations n'ont pas été démontrées sur la zone de la muqueuse olfactive, on peut imaginer des différences similaires et donc une certaine variabilité interindividuelle lors de l'ANC.

De plus, de fortes variations peuvent survenir chez un même patient, notamment en cas de rhume ou de rhinite allergique avec de fortes sécrétions de mucus qui peuvent limiter l'action du principe actif et le passage du nez au cerveau (322). Lorsque l'on imagine un traitement à long terme, notamment dans le cadre de la MA, ces variations seraient à prendre en compte. De plus, des administrations répétées peuvent causer des effets indésirables locaux : des irritations, des altérations de la muqueuse ou des anosmies par exemple (322). Ces éléments devront peser dans la balance bénéfice-risque lors de l'évaluation du médicament et il est donc important de formuler un produit non irritant et sans odeur.

De plus, le processus d'industrialisation est à prendre en compte. Différentes méthodes d'automatisation de la synthèse des NPs ont été développées. C'est le cas notamment de la synthèse via la technologie microfluidique. Cette technique met en contact des volumes très faibles de différentes solutions dans une puce composée de différentes tubulures capillaires. Par rapport aux méthodes de synthèse communément utilisées en laboratoire, la technologie microfluidique permet la manipulation précise des liquides, une grande efficacité de mélange et une grande reproductibilité (323). Cette méthode peut être facilement industrialisable grâce à de nouveaux appareils qui permettent la production de très petits volumes jusqu'à la production en continu des NPs (324). Des NPs d'acide polylactique-co-glycolique (PLGA) ont déjà été synthétisées avec succès grâce à la technologie microfluidique avec une taille de 91 nm et un PDI de 0,163 (324). Cette technologie pourrait être utilisée pour nos formulations pour remplacer le processus de nanoprécipitation. La suite du protocole implique l'évaporation du solvant, qui n'est pas comprise dans la synthèse utilisant la technologie microfluidique. Cependant, les étapes d'encapsulation ou d'adsorption semblent pouvoir se faire également grâce à cette méthode.

Enfin, le domaine des nanotechnologies est encore émergent et de nombreuses questions se posent quant à leur sûreté et leur utilisation possible à grande échelle. Ici encore, le manque de consensus concernant la caractérisation et l'évaluation des NPs est important. La Pharmacopée Européenne n'a toujours pas de monographie spécifique des NPs. Il reste donc encore de nombreuses étapes avant de pouvoir valider un médicament à base de NPs pour l'ANC chez l'humain.

MATERIEL ET METHODES

I. Synthèses des nanoparticules

A. Synthèse des NP-PLA

Les NP-PLA sont préparées par la méthode de nanopréciipitation décrite précédemment (325). Le PLA est dissous dans l'acétone (10 mg/mL, Carlo Erba, France) pendant 10 minutes. Puis la solution est ajoutée goutte à goutte à une solution de carbonate de sodium 5 mM (Sigma Aldrich, Etats-Unis) sous agitation magnétique (250 rpm), à température ambiante. Les solvants sont ensuite enlevés de la solution en diminuant la pression et en contrôlant la température (30°C) grâce à un évaporateur rotatif (Rotavapor® R-300, Buchi, France). Avant l'utilisation en milieu biologique, les NPs sont resuspendues en eau (Aguettant, France). Pour cela, elles sont centrifugées 20 min à 16 000 rpm à température ambiante. Le surnageant est remplacé par de l'eau.

B. Synthèse des NP PLA Polox (hybrides et couronnes)

Les NP-PLA-Poloxamère (soit le P188, soit le P407, BASF, Allemagne) sont synthétisées de deux manières différentes : une synthèse en une seule étape et une synthèse en deux étapes. Tout d'abord, la synthèse en une étape, qui permet d'obtenir les NP-PLA-P188 et les NP-PLA-P407, se base sur la même méthode de nanopréciipitation que pour les NP-PLA, excepté que le poloxamère est dissous dans le tampon carbonate de sodium (5 mM) à une concentration de 0,5 à 20 mg/mL. La synthèse en deux étapes, quant à elle, permet d'obtenir les NP-PLA-cP188 et les NP-PLA-cP407. La première étape consiste à synthétiser des NP-PLA comme décrits précédemment. Puis cette solution de NP-PLA est ajoutée goutte à goutte à une solution de poloxamère de 0,5 à 20 mg/mL. Le mélange est ensuite placé sur une roue d'agitation à 18 rpm, pendant 2 h, à température ambiante. De la même manière que précédemment, les NPs obtenues sont resuspendues en eau par centrifugation avant utilisation.

C. Synthèse des nanoparticules fluorescentes

Les NPs fluorescentes sont préparées en utilisant différents fluorophores : le DY650 (λ_{ex} : 653 nm et λ_{em} : 674 nm, Dyomics, Allemagne) et le DiR (λ_{ex} : 750 nm et λ_{em} : 780 nm, Revvity, Etats-Unis). De la même manière qu'expliqué précédemment, les NPs sont synthétisées en ajoutant le fluorophore choisi dans la phase organique avant la nanopréciipitation de la phase organique dans la phase aqueuse à un taux de chargement de 0,02 %. Les formulations sont également resuspendues dans l'eau après centrifugation. L'encapsulation du fluorophore est vérifiée en mesurant la fluorescence du surnageant (après

une centrifugation de 20 min à 16 000 rpm à température ambiante) et de la formulation totale grâce à lecteur de microplaque Spark® (Tecan, Suisse).

D. Synthèse des nanoparticules contenant de l'hafnium

Les NPs d'oxyde d'hafnium (HfO_2) sont synthétisées par une équipe de recherche du laboratoire de chimie de l'École Normale Supérieure (ENS) de Lyon, avec les Drs Olivier Maury, Frédéric Chaput et Frédéric Lerouge. L'oxychlorure d'hafnium (IV) octahydraté ($\text{HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) est dissous dans la N-méthyl-2-pyrrolidone. Après plusieurs minutes d'agitation, une solution transparente est obtenue. Le milieu réactionnel est ensuite transféré dans un autoclave en acier inoxydable revêtu de téflon. Après scellement, l'autoclave est chauffé à 200°C et maintenu à cette température pendant 3 h tout en agitant le milieu réactionnel. Après refroidissement, le produit brut de la réaction est précipité dans l'acétone. La précipitation des NPs de HfO_2 est immédiate et complète. Elles sont isolées par centrifugation. Le culot de centrifugation est dispersé dans de l'eau déminéralisée à l'aide d'ultrasons. Ce processus de lavage est répété plusieurs fois afin de parfaire la purification des NPs. Le culot final est dispersé dans de l'eau déminéralisée afin d'obtenir une solution colloïdale transparente et concentrée. L'acétone présente dans la solution est éliminée sous vide.

Les NPs contenant des NPs d' HfO_2 sont préparées par la méthode de nanoprécipitation décrite dans la section I.A. Le PLA est dissous dans l'acétone (20 mg/mL) pendant 10 minutes. Les NPs d'oxyde d' HfO_2 (fourni par le Laboratoire de Chimie de l'École Normale Supérieure (ENS) de Lyon) sont ajoutées dans la phase organique (2 %). La phase aqueuse est préparée en mélangeant de l'eau et de l'éthanol absolu (2:1, v/v, Carlo Erba, France). Puis la phase organique est ajoutée goutte à goutte à la phase aqueuse avec un ratio organique/aqueuse de 1,5 sous agitation magnétique (250 rpm), à température ambiante. Les solvants sont ensuite enlevés de la solution en diminuant la pression et en contrôlant la température (30°C) grâce à un évaporateur rotatif (Rotavapor® R-300, Buchi, France).

E. Synthèses des NP- HfO_2 avec les molécules anticancéreuses

Les synthèses se font exactement de la même manière que décrit dans la section I.D. Un volume de chaque molécule anticancéreuse fournie par le CRCL est ajouté dans la phase organique afin d'obtenir les concentrations finales de 5 mg/kg pour la perhexiline (27 μM) et 10 mg/kg pour la sertraline (44 μM).

F. Adsorption du peptide bloquant sur les nanoparticules

Les NPs sont synthétisées comme mentionné dans la section I.B. Elles sont ensuite resuspendues en eau par centrifugation (16 000 g, pendant 20 min, à température ambiante). Une mesure de leur concentration est effectuée par mesure du taux de solide (section II.B.2) et elles sont diluées dans l'eau pour obtenir une concentration de 2 %.

Une solution de peptide bloquant (BP) à 200 µg/mL est préparée à partir d'une solution mère à 20 mM dans de l'eau. Puis, les NPs sont ensuite ajoutées goutte à goutte dans la solution de BP, à volume équivalent. Puis les formulations sont placées sur une roue d'agitation pendant 2 h à 18 rpm, à température ambiante. Les formulations sont ensuite conservées à 4°C. A noter qu'aucune étape de lavage de ces NPs n'est réalisée pour éliminer les résidus éventuels de peptide libre.

II. Caractérisation physicochimique des nanoparticules

A. Diamètre hydrodynamique et charge de surface

Le diamètre hydrodynamique moyen et la distribution de la taille des NPs (indice de polydispersité, PDI) sont déterminés en mesurant la diffusion dynamique de la lumière (DLS) à un angle de 173° et à 25°C grâce à l'appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Royaume-Uni). La mobilité électrophorétique (potentiel zêta) est déterminée par vélocimétrie laser grâce au même appareil. Pour cela, 15 µL de la suspension de NPs sont dilués dans 1,5 mL de NaCl 1 mM (Sigma Aldrich, Etats-Unis), cette solution de NaCl 1 mM étant préalablement filtrée à 0,22 µm (Merck, Allemagne). La solution de NPs est placée dans une cellule capillaire avec des électrodes qui permet la mesure des trois paramètres. La valeur résultante est la moyenne de trois répliques techniques de l'appareil.

B. Détermination de la concentration

1. Par la diffusion dynamique de la lumière

En utilisant cette DLS, avec un appareil qui permet d'effectuer les mesures à plusieurs angles, il est possible de déterminer la concentration en NPs. Nous avons utilisé l'appareil Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, Royaume-Uni) pour mesurer la concentration en NPs, à 25°C. Pour cela, nous avons dans un premier temps réalisé la mesure sur le tampon carbonate 5 mM pour établir le blanc. Puis nous avons préparé nos échantillons dans du NaCl 1 mM comme expliqué ci-dessus. La solution est ensuite placée dans une cuve de spectrométrie (Sarstedt, Allemagne) et la mesure est réalisée trois fois par l'appareil.

2. Par le taux de solide

Le taux de solide est obtenu en pesant une coupelle de pesée antistatique vide puis contenant un volume de 100 μL de formulation avant et après séchage sous vide à 35°C pendant 45 minutes. La valeur finale est le rapport entre la masse séchée et la masse humide en pourcentage. Le taux de solide est relié à la concentration en NPs par le biais du diamètre des NPs et de la densité du PLA.

Le taux de solide dans le surnageant, utilisé pour estimer la quantité de polymères en dehors des NPs est effectué sur le surnageant des NPs. Dans un premier temps, le taux de solide de la formulation est mesuré puis homogénéisé à 2 % en diluant les NPs dans la solution de carbonate de sodium 5 mM. Les NPs sont centrifugées 20 min à 16 000 rpm à température ambiante puis 400 μL du surnageant sont séchés dans une coupelle de pesée antistatique sous vide à 35°C pendant 45 minutes. La coupelle de pesée est pesée vide, avant et après séchage. Le calcul est le même que pour les formulations totales.

C. Modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire a été faite avec des méthodes de simulation de dynamique des particules dissipative (DPD) à l'aide du logiciel Materials Studio 2017 (Biovia, France). Pour les molécules d'eau, une approche à gros grains a été utilisée où une bille représente trois molécules d'eau. Le rayon de la bille d'eau a été fixé à 2,78 Å et sa masse moléculaire à 54 Da. Toutes les longueurs de chaîne des molécules de PLA et de poloxamère ont été ramenées à un rapport de 1/5 afin de correspondre à la taille des NPs simulées (environ 20 nm pour le diamètre final dans nos simulations, contre environ 100 nm pour les NP produites expérimentalement). En conséquence, les molécules de PLA ont été construites comme des répétitions linéaires de 140 unités de monomères d'acide lactique (LA)_n. Des billes spéciales ont été créées pour chaque extrémité de la chaîne PLA, avec une bille de début et une bille de fin afin de prendre en compte la fonction hydroxy au début de la chaîne et la fonction acide carboxylique à la fin de la chaîne.

Pour le P188, une molécule a été obtenue avec l'organisation suivante : 16 oxydes de polyéthylène (PEO) - 5 oxydes de polypropylène (PPO) - 16 PEO. En conséquence, le P407 a été simulé avec une molécule organisée comme suit 20 PEO-12 PPO-20 PEO. Une bille spéciale supplémentaire a été créée pour les extrémités des poloxamères afin de tenir compte de la fonction hydroxy au début et à la fin de chaque chaîne de poloxamères.

Pour les calculs, tous les paramètres de solubilité δ_i ont été calculés avec le logiciel, en utilisant soit le module Synthia pour les polymères, soit des modèles construits avec le module

Cellules amorphes, soit une combinaison des deux méthodes. Pour les modèles construits comme des cellules amorphes, tous les calculs ont été effectués avec le module Forcite en utilisant le champ de force COMPASS II pour les paramètres atomiques et les charges partielles.

Les paramètres de solubilité correspondants ont ensuite été utilisés pour calculer les paramètres d'interaction de Flory-Huggins χ_{ij} pour les mélanges binaires correspondants, qui ont été calculés à l'aide de la relation : $\chi_{ij} = (v/RT) (\delta_i - \delta_j)^2$ où R est la constante des gaz, T la température absolue et v le volume moyen par mole des deux composants correspondants (326). Les volumes molaires de chaque composant ont été déterminés à l'aide du logiciel MOE. Les paramètres d'interaction Flory-Huggins ont ensuite été convertis en paramètres de répulsion DPD a_{ij} , qui ont été obtenus en utilisant la relation $a_{ij} = 25 + 3,50 \chi_{ij}$ (327).

Nos calculs ont été effectués en utilisant des boîtes périodiques cubiques de 300x300x300 Å d'eau comme points de départ pour toutes les dynamiques. Pour les séries NP-PLA-P188 et NP-PLA-P407, des gouttelettes d'un rayon de 140 Å contenant un mélange désordonné de molécules d'eau, de PLA et de poloxamère (respectivement P188 et P407) ont été placées en leur centre.

Afin de reproduire les proportions expérimentales des molécules de PLA et de poloxamère pendant la nanoprécipitation, nous avons utilisé le rapport de masse suivant dans le logiciel : PLA/poloxamère de 2:1 et eau/polymère de 1:1. Dans les deux cas (NP-PLA-P188 et NP-PLA-P407), le reste de la boîte de simulation a été rempli d'eau.

Pour les expériences pour obtenir les NP-PLA-cP188 et les NP-PLA-cP407, nous avons commencé notre simulation avec une gouttelette centrale condensée de PLA (avec un rayon de 99 Å) contenant seulement 5 % d'eau (en masse) en utilisant le rapport de masse suivant : eau 5 et PLA 95. Une coquille de poloxamère (P188 ou P407) contenant 5 % d'eau en masse a été ajoutée autour de la gouttelette de PLA (avec une épaisseur de 14 Å). Le diamètre de la gouttelette de PLA et de la coquille de poloxamère a été calculé de manière à conserver un rapport de masse de 2:1 entre le PLA et le poloxamère, tout en s'assurant que la masse totale de PLA et de poloxamère soit identique à celle utilisée dans les deux premiers modèles NP-PLA-P188 et NP-PLA-P407. Dans les deux cas (NP-PLA-cP188 et NP-PLA-cP407), le reste de la boîte de simulation a été rempli d'eau.

Tous les calculs DPD comprenaient une optimisation initiale de la géométrie avec 250 étapes de gradient conjugué. Les DPD ont ensuite été effectuées en utilisant une échelle de temps de 2,6 ps. Pour chaque cycle de DPD, nous avons utilisé un total de 230 000 étapes avec un pas de temps de 0,05, conduisant à un temps total de simulation d'environ 30 ns. Une

optimisation finale de la géométrie (250 étapes de gradient conjugué) a finalement été effectuée avant l'analyse des structures.

D. Étude de la stabilité des nanoparticules

Pour évaluer la stabilité des NPs en milieu biologique, le mucus artificiel a été synthétisé selon un protocole décrit précédemment (233). Brièvement, 8 % (m/v) de mucine de type II issue de l'estomac de porc (Sigma Aldrich, Etats-Unis) ont été dissous dans une solution de NaCl, KCl, et CaCl_2 (Sigma Aldrich, Etats-Unis). Le pH a ensuite été ajusté à 5,7 avec du NaOH 1 M (Sigma Aldrich, Etats-Unis). Les NPs (2 %) sont diluées dans le mucus, incubées à 37°C, et caractérisées par la méthode de DLS décrite précédemment. Le diamètre, l'homogénéité et la charge sont déterminés par trois répliques de l'appareil et trois lots de NPs différents.

De la même manière, du liquide céphalo-rachidien (LCR) est préparé en utilisant 0,6 % d'albumine de sérum bovin (BSA, Euromedex, France) dans une solution de NaCl, KCl, MgCl_2 , CaCl_2 , Na_2CO_3 , Na_2HPO_4 , D-glucose, et d'acide L-ascorbique (Sigma Aldrich, Etats-Unis) (220). Le pH est ajusté à 7,35. Les NPs (2 %) sont diluées dans le LCR, incubées à 37°C, et caractérisées également par la méthode de DLS décrite précédemment. Le diamètre, l'homogénéité et la charge sont déterminés par trois répliques de l'appareil et trois lots de NPs différents.

E. Microscopie électronique à transmission

Les NP-HfO₂ ont été évaluées par microscopie électronique à transmission (MET) et à balayage (MEB) au Laboratoire de Chimie de l'ENS. Les analyses en MET ont été effectuées avec un MET JEM-2100F (Jeol, Japon) fonctionnant à 200 kV équipé d'une caméra (Gatan, Etats-Unis). Les échantillons ont été préparés en disposant les formulations sur des grilles de cuivre de 300 Mesh recouvertes d'un film de carbone ultrafin.

F. Évaluation de l'adsorption du peptide bloquant sur les nanoparticules

L'adsorption du BP sur les NPs se mesure de façon indirecte. La quantification du BP non adsorbé dans le surnageant des NPs, après centrifugation des NP-BP (16 000 g, 20 min, température ambiante), se fait grâce au kit de quantification CBQCA (ThermoScientific, Etats-Unis). Cette méthode utilise le 3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (CBQCA) qui permet de quantifier les fonctions amines et notamment celles présentent dans les peptides ou les protéines. La réaction, en présence de cyanure de potassium, permet d'obtenir des composés fluorescents.

Le protocole utilisé est celui fourni avec ce kit. Brièvement, deux gammes étalons sont préparées à partir de la solution de BSA à 4 mg/mL et à partir de la solution de BP utilisée pour l'adsorption. Dans une plaque 96 puits (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) noirs à fond transparent sont ajoutés les échantillons, puis 3 % de KCN 20 mM présent dans le kit, puis 6 % de la solution ATTO-TAG 5 mM du kit. Les plaques sont laissées incuber 3 h à température ambiante sous agitation légère. Puis la lecture de la plaque se fait à l'aide d'un lecteur de microplaques multimode Spark® (λ_{ex} : 465 nm, λ_{em} : 550 nm, Tecan, Suisse).

III. Évaluation *in vitro*

A. Évaluation de l'activité du peptide bloquant

Cette évaluation a été effectuée au Laboratoire MeLis par la Dre Pauline Bouvet. Nous souhaitons comparer l'effet du BP sur la fibrillation de la protéine A β (Bachem, Suisse). Dans un premier temps, la protéine A β est reconstituée dans du DMSO puis diluée dans du PBS 1X (ThermoScientific, Etats-Unis) afin d'atteindre une concentration théorique de 150 μ M. La solution est ensuite passée au sonicateur pendant 20 min à 4°C puis centrifugée 3 min à 10 000 g et à 4°C. Le surnageant est récupéré et dosé. Cette solution de protéine A β est ensuite diluée pour obtenir une concentration de 10 μ M et est incubée avec la même concentration de BP seul ou adsorbé à la surface des NPs pendant 2 h à 37°C sous agitation légère. Elle est également incubée de la même manière avec des NPs sans BP. Les échantillons sont ensuite dénaturés avec un tampon Laemmli 4X/DTT 1M (3:1) pendant 5 min à 95°C. Les culots et les surnageants sont ensuite placés dans les puits du Western Blot.

Le Western Blot est composé d'un gel Bis-Tris de 4 à 12 %. Le tampon de migration est composé de MES (acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique) qui est adapté pour les protéines de bas poids moléculaire. La migration se fait avec 70 V pendant 10 min puis 120 V pendant 1 h à 1 h 30. Les échantillons sont ensuite transférés sur membrane de nitrocellulose grâce au tampon de transfert Tris-Glycine 1X, 20 % d'éthanol dans l'eau pendant 1 h à 120 V. Un blocage est fait avec un tampon TBST (Tris-Buffered Saline avec du Tween 20), puis la révélation est effectuée avec un anticorps anti-A β (1/500, Biolegend, Etats-Unis) sur la nuit à 4°C. Puis un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la HRP (Horseradish Peroxidase) est utilisé. Enfin, la prise d'images se fait par un système de détection ECL (Enhanced Chemiluminescence) puis l'intensité des bandes est faite avec une analyse densitométrique par le logiciel ImageJ (Etats-Unis).

B. Dégradation du peptide bloquant

Cette expérience a été effectuée au Laboratoire MeLis par la Dre Pauline Bouvet. Pour faire ce test, des cellules ont été dédifférenciées en cellules souches pluripotentes induites (iPSs). Ces dernières ont été ensuite différenciées en neurones et le milieu de culture de ces cellules, contenant de la chymotrypsine, a été récupéré. Les différentes formulations avec du BP biotinylé (bBP) seul ou adsorbé à la surface des NP-PLA-P188, ont été incubées avec ce milieu conditionné de neurones pendant 30 min à 37°C. Deux concentrations de milieu ont été testées 1,25 et 2,5 µg/mL de protéines totales et deux milieux conditionnés de neurones ont été testés également. En fin d'incubation, le bBP est décroché des NPs par l'ajout de NaCl 500 mM, le bBP n'étant pas détecté lorsqu'il est sur les NPs. Un dot blot est ensuite réalisé en déposant chaque condition sur le Dot Blot. Les échantillons sont ensuite bloqués avec un tampon TBST puis un anticorps anti-biotine (Abcam, Royaume-Uni) est ajouté pour détecter le bBP sur la nuit à 4°C. Puis comme décrit dans la section III.A, un anticorps couplé à l'HRP est utilisé et le système de détection est le même.

C. Cellules

Les RPMI 2650, qui sont des cellules humaines de l'épithélium nasal, ont été obtenues à l'ATCC (Etats-Unis). Elles sont cultivées dans un milieu de culture MEM (Sigma-Aldrich, Etats-Unis), auquel on ajoute 10 % de sérum de veau fœtal (ThermoScientific, Etats-Unis) ainsi qu'1 % de pénicilline/streptavidine (ThermoScientific, Etats-Unis). Elles sont cultivées dans un incubateur (ThermoScientific, Etats-Unis) avec 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité.

Les PC12 sont des cellules issues de la glande surrénale de rat obtenues également à l'ATCC (Etats-Unis) et sont cultivées dans du milieu DMEM (ThermoScientific, Etats-Unis) avec 10 % de sérum de cheval (ThermoScientific, Etats-Unis), 5 % de sérum de veau fœtal et 1 % de pénicilline/streptavidine. Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C, avec 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité. Lors du changement de milieu ou du passage des cellules, les cellules en suspension sont récupérées en centrifugeant le surnageant à 1200 g pendant 5 minutes.

Les PC12 peuvent être différenciées en cellules neuronales. Pour cela, les cellules sontensemencées dans des plaques de culture préalablement recouvertes de collagène de type I (ThermoScientific, Etats-Unis) à faible densité dans le même milieu de culture que celui utilisé pour les amplifier. Lors de l'ensemencement, les plaques sont laissées 30 minutes sans les déplacer afin d'avoir un ensemencement homogène dans le puits. Les plaques sont ensuite replacées dans l'incubateur. Deux heures après l'ensemencement, le milieu de culture est remplacé par un milieu de différenciation composé de milieu OptiMEM (ThermoScientific, Etats-Unis) auquel on a ajouté du GlutaMax 4 mM (ThermoScientific, Etats-Unis), 0,5 % de

sérum de veau fœtal et 50 ng/mL de NGF- β (R&D Systems, Etats-Unis). Le milieu est changé tous les deux jours pendant 7 jours pour obtenir des cellules différenciées présentant des projections de type axonal. Les expériences se feront systématiquement 7 jours après l'ensemencement des cellules.

D. Viabilité cellulaire

Avant les tests de viabilité, les cellules PC12 ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits noires, à fond transparent (Greiner Bio-One, Allemagne) et différenciées pendant 7 jours. Les cellules RPMI ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits similaires pendant 24 heures. Les cellules ont été comptées et les formulations ont été placées sur la culture cellulaire à une concentration de 10^5 NP par cellule. Après 24 h d'incubation à 37°C, 10 μ L du réactif de viabilité cellulaire PrestoBlue™ (ThermoScientific, USA) ont été ajoutés dans chaque puits pendant 30 min à 37°C, pour un volume total de 110 μ L. Le réactif PrestoBlue™ est une solution à base de résazurine qui permet de quantifier la viabilité des cellules, les cellules vivantes étant capables de convertir la résazurine en résorufine qui est fluorescente. Cette fluorescence a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques multimode Spark® (λ_{ex} : 560 nm, λ_{em} : 590 nm, Tecan, Suisse). Les valeurs de viabilité cellulaire ont été déterminées en utilisant trois répétitions et trois expériences indépendantes.

E. Internalisation des nanoparticules par les cellules

1. Microscopie confocale

Tout d'abord, les cellules PC12 ont été ensemencées à une densité cellulaire de 100 000 cellules par cm^2 et différenciées dans des plaques de 24 puits (Corning Inc., Etats-Unis) recouvertes de collagène de type I pendant 7 jours comme décrit dans la section C. Ensuite, les cellules RPMI 2650 ont été placées dans des plaques de 24 puits à une densité cellulaire de 50 000 cellules par cm^2 et incubées pendant 72 h.

Des NP fluorescentes (DY650) ont été ajoutées sur les cellules, à une concentration de 10^5 NP par cellule pendant 1 h ou 3 h. Après incubation, les cellules ont été rincées avec du PBS 1X, fixées avec 4 % de paraformaldéhyde (PFA, Sigma Aldrich, Etats-Unis) pendant 20 minutes à température ambiante puis rincées avec du PBS 1X. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec 0,1 % de Triton 100X (Euromedex, France) dans du PBS 1X. Les cellules ont été incubées avec de la phalloïdine marquée à l'Alexa Fluor 488 (ThermoScientific, Etats-Unis) (1:20 dans 0,2 % de BSA, 0,1 % de Triton 100X dans du PBS 1X) pendant 20 minutes à température ambiante. Après rinçage des cellules, un marquage au DAPI (ThermoScientific, Etats-Unis) a été réalisé (1/1000 dans du PBS 1X) pendant 5 minutes à température ambiante.

Les images ont été prises à un grossissement de x20 à l'aide d'un microscope confocal (LSM800, Zeiss, Allemagne). Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Fiji (ImageJ, Etats-Unis) afin d'homogénéiser la luminosité et le contraste.

2. Cytométrie en flux

Les cellules PC12 ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits transparentes à fond plat (Sigma Aldrich, Etats-Unis), à une concentration de 850 cellules/ μ L et différenciées pendant 7 jours. Les cellules RPMI 2650 ont étéensemencées de la même manière et cultivées 48 h. Puis, les NPs fluorescentes (DY650) sont déposées sur les cellules à une concentration de 10^5 NPs/cellule. Les NPs sont laissées sur les cellules 1 h ou 3 h. Une fois le temps écoulé, les cellules sont rincées avec du PBS 1X et décollées de la plaque grâce à la trypsine. La trypsine est ensuite inactivée avec du milieu de culture. Les cellules sont ensuite récupérées dans des tubes de cytométrie, centrifugées à 400 g et à 4°C pendant 5 min. Le surnageant est enlevé et remplacé par du PBS supplémenté en SVF 2 %. Les cellules sont ensuite analysées au cytomètre en flux LSR Fortessa 5L (BD Biosciences, Etats-Unis). Les données sont ensuite analysées grâce au logiciel OMIQ (Dotmatics, Etats-Unis) pour isoler dans un premier temps les cellules seules, puis les cellules ayant internalisé des NPs fluorescentes. Les résultats sont exprimés en pourcentage des cellules fluorescentes seules par rapport au total des cellules seules.

IV. Évaluation *in vivo*

A. Animaux

Les études *in vivo* ont été réalisées dans l'animalerie P-PAC (Plateforme du Petit Animal du CRCL) du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL) et dans l'animalerie PBES (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris) de l'École Normale Supérieure de Lyon. Les expériences ont été réalisées conformément à la réglementation sur le bien-être des animaux pour leur utilisation à des fins scientifiques régie par la directive européenne 2010/63/UE. Les protocoles ont été validés par les comités locaux d'évaluation de l'éthique animale (ACCeS et CECCAPP) et autorisés par le Ministère français de l'éducation et de la recherche (dossiers APAFIS n° 26061-2020052519063513, n°52115-2024062014595993 et n° 48165–2023102618 134945).

B. Biodistribution

1. Évaluation en fluorescence

Les études de biodistribution ont été réalisées sur des souris femelles SKH1 âgées de 6 mois (Charles River, France). Avant l'administration, les NPs fluorescentes (DiR) ont été diluées pour se placer à une concentration en NPs de 10^{10} NPs/mL. Après une anesthésie gazeuse à l'isoflurane 3,5 %, les animaux ont été penchés en arrière à 45° et ont reçu lentement 10 µL de formulation dans chaque narine (n=4 souris par groupe). Les souris ont été maintenues dans cette position pendant quelques secondes avant d'être placées sur le ventre dans le système d'imagerie fluorescente *in vivo* ouvert, le système d'imagerie KIS 800 (Kaer Imaging System, KaerLabs, France). Les images ont été prises pendant que les souris étaient anesthésiées en utilisant un temps d'exposition de 500 ms. Le filtre utilisé était celui correspondant au DiR (λ_{ex} : 785 nm et λ_{em} : 800 nm). Des images ont ensuite été prises à 1 h, 3 h, 6 h et 24 h.

Afin d'obtenir une localisation plus précise de la fluorescence, 3 h après l'administration des NP fluorescentes (DiR), les cerveaux et les poumons ont été prélevés et observés à l'aide du même système d'imagerie KIS 800. Les images ont été prises avec un temps d'exposition de 1 000 ms.

Dans les deux cas, les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Fiji (ImageJ, Etats-Unis) et la quantification de la fluorescence a été réalisée. Pour ce faire, à partir d'une image en échelle de gris du signal de fluorescence, la luminosité et le contraste ont été homogénéisés. Un seuil a ensuite été appliqué à toutes les images et la densité intégrée du signal a été mesurée sur l'ensemble de l'image, ou uniquement sur le cerveau ou les poumons. Ce chiffre a été comparé à la densité intégrée du signal au temps d'administration.

2. Transparisation

Nous avons réalisé des expériences de transparence en administrant des NPs fluorescents (DY650) à des souris CB6F1 femelles âgées de deux mois. Ces souris ont reçu différentes formulations comme décrit dans la section IV.B.1. Après 3 h, les souris ont été euthanasiées avec de la kétamine (Imalgène, Merial, France) et de la xylazine (Rompun, Centravet, France) par voie intrapéritonéale puis perfusées en intracardiaque avec 20 mL de PFA 4 % puis 20 mL de PBS 1X.

Dans un premier temps, nous avons disséqué la tête comme décrit précédemment (20). Les têtes sont placées pendant 3 jours dans du PFA 4 %, puis rincées deux fois dans du PBS 1X. Elles sont ensuite décalcifiées à l'aide du réactif Osteosoft® (Sigma Aldrich, Etats-Unis)

pendant 14 jours à 4°C. Dans un second temps, nous avons récupéré les poumons et le cerveau des souris que nous avons fixés 2 h dans du PFA 4 % puis rincés deux fois dans du PBS 1X.

Les échantillons sont ensuite perméabilisés grâce à la solution de perméabilisation du kit de transparation MACS® (Miltenyi Biotec, Allemagne) pendant 24 h à température ambiante. Puis les échantillons sont déshydratés avec des solutions de PBS 1X contenant 2 % de Tween 20 (Euromedex, Franc et des concentrations croissantes éthanol absolu filtré à 0,22 µm. Cette déshydratation se fait sous agitation, à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant environ 32 h. Les échantillons sont ensuite dépigmentés grâce à une solution de peroxyde d'hydrogène (7,5 mg/mL, Sigma-Aldrich, Etats-Unis) dans de l'éthanol absolu filtré à 0,22 µm pendant 16 h à 4°C, puis les échantillons sont centrifugés 1 h à 400 rpm à 4°C. Les échantillons sont ensuite placés dans une solution de transparation du kit MACS® pendant 3 jours à température ambiante. Les échantillons transparents sont ensuite conservés dans de l'éthylcinnamate (Sigma-Aldrich, Etats-Unis). Ils seront ensuite observés grâce à un microscope à feuillets de lumière sur la plateforme LyMIC/PLATIM de la SFR Biosciences (UAR3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL ; Miltenyi Biotec, Allemagne).

3. Tomodensitométrie

Après administration intranasale de NP-HfO₂, les têtes de souris sont disséquées et fixées dans du PFA 4 % pendant 3 jours à température ambiante sous agitation faible. Puis, la décalcification a été réalisée à l'aide du réactif Osteosoft® (Sigma Aldrich, Etats-Unis) pendant 14 jours à 4°C sous agitation faible. Les échantillons sont ensuite déshydratés par des bains d'éthanol à concentrations croissantes. Afin de marquer les tissus mous, des bains d'iodure de sodium (Merck, Allemagne) ont été réalisés. Pour cela, les échantillons sont placés dans une solution d'iodure de sodium pendant 6 jours. Cette coloration à l'iodure de sodium est réversible et peut être enlevée grâce à des bains d'éthanol 70 %. Les images ont ensuite été prises à l'aide d'un tomographe à rayons X (Phoenix Nanotom S, General Electrics, Etats-Unis). Les échantillons ont été scannés en utilisant un filtre en cuivre de 0,1 mm, une tension de 100 kV et un courant de 70 µA. Nous avons obtenu des superpositions d'images de 3000 rayons X successifs pour chaque échantillon avec un temps d'exposition de 500 ms par image. Après avoir reconstruit les volumes en 3D à l'aide du logiciel Phoenix dédié, les volumes ont été segmentés à l'aide de VG Studio Max 2.2. Des volumes tridimensionnels des têtes de souris ont été générés avec des tailles de voxel allant de 7 à 15 µm.

C. Coupes de cavités nasales

1. Immunohistochimie des cavités nasales

Comme décrit par d'autres équipes de recherche (328), après dissection de la tête des souris, celles-ci ont été fixées dans du PFA 4 % pendant 3 jours à température ambiante. Ensuite, la décalcification a été réalisée à l'aide du réactif Osteosoft® (Sigma Aldrich, Etats-Unis) pendant 7 jours à 4°C. La cryoconservation a été réalisée avec une solution de sucrose à 30 % (Sigma Aldrich, Etats-Unis) pendant 3 jours à 4°C. Ensuite, les têtes ont été placées dans un mélange de sucrose 30 % et de milieu d'enrobage spécifique pour le cryostat (OCT, Sakura Finetek, Pays-Bas) (50/50 v/v) pendant 1 h, puis uniquement dans l'OCT pendant 1 h, avant de congeler l'échantillon à l'aide de carboglace et de le placer à -70°C jusqu'au traitement. L'ensemble des manipulations sont faites sous agitation faible jusqu'à la congélation des échantillons.

A l'aide d'un cryostat (Leica Biosystems, Allemagne), des coupes coronales de 15 µm d'épaisseur ont été réalisées. Comme décrit dans la littérature (328), les coupes ont été bloquées avec 1 % de BSA et perméabilisées avec 0,1 % de Triton 100X dans du PBS 1X. Les sections ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-GAP43 (Novus Biologicals, Etats-Unis) (1:500 dans 0,2 % de BSA, 0,1 % de Triton 100X dans du PBS 1X) pendant une nuit à 4°C. Après rinçage des sections avec une solution de 0,1 % Triton 100X dans du PBS 1X, un anticorps secondaire fluorescent anti-IgG de lapin DyLight 488 (ThermoScientific, Etats-Unis) a été ajouté (1:500 dans un tampon similaire à celui de l'anticorps primaire) pendant 2h à température ambiante. Si besoin, un marquage avec la streptavidine (DyLight 488 ou DyLight 550, ThermoScientific, Etats-Unis) pour détecter le peptide bloquant biotinylé a été réalisé (1:200 dans 0,2 % de BSA, 0,1 % de Triton 100X dans du PBS 1X) pendant 45 minutes à température ambiante. Enfin, un marquage au DAPI (ThermoScientific, Etats-Unis) a été réalisé (1/1000 dans du PBS 1X) pendant 5 min à température ambiante. Les images ont été prises à l'aide d'un microscope à fluorescence inversé (Nikon Instruments, Etats-Unis), ou d'un microscope confocal Spinning-Disk (Yokogawa, Japon). Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Fiji (ImageJ, Etats-Unis) afin d'homogénéiser la luminosité et le contraste.

Afin de quantifier le nombre de NPs sur chaque coupe du bulbe olfactif, nous avons réalisé plus d'une dizaine d'images du bulbe olfactif à différents endroits, sur les deux bulbes et sur plusieurs coupes différentes. En utilisant le logiciel Fiji (ImageJ, Etats-Unis), nous avons, dans un premier temps, homogénéisé la luminosité et le contraste pour toutes les images du canal rouge (correspondant aux NPs). Puis nous avons appliqué un seuillage identique pour toutes les images. Puis l'outil d'analyse des particules du logiciel est appliqué et nous filtrons

les particules circulaires comprises entre 0,1 et 10 μm . Le nombre de NPs a ainsi été obtenu et a pu être analysé.

2. Kratoscope

Nous avons administré différentes formulations aux souris par voie intranasale comme décrit dans la section IV.B.1 et nous avons récupéré, traité et congelé leur tête comme décrit dans la section IV.C.1. Nous avons ensuite pu envoyer les échantillons à la société KaerLabs (France) pour une analyse au Kratoscope. Le système d'imagerie Kratoscope (KaerLabs, France) permet d'imager chaque section faite par le cryostat de manière complètement automatisée. Cette technique permet également d'observer un signal de fluorescence (ici, les NPs fluorescentes, DY650).

Comme décrit dans la littérature (329), l'échantillon enrobé d'OCT a été monté sur un cryostat (Leica Biosystems, Allemagne) avec un système de transfert de section. La caméra est positionnée devant la surface du bloc, qui est séquentiellement imagé et sectionné. Le processus est complètement automatisé et contrôlé par le logiciel lié à l'appareil. Les images du bloc ont été capturées en utilisant l'autofluorescence des tissus en excitant l'échantillon avec une lumière de 405 nm et en détectant les NPs avec un laser à 640 nm avec un temps d'exposition de 1000 ms et un filtrage de la lumière transmise à 650 nm. Ensuite, des sections de 18 μm d'épaisseur ont été coupées et les images collectées de la face du bloc fraîchement coupée ont été rendues pour générer un volume 3D. Les images sont ensuite traitées avec Fiji (ImageJ, Etats-Unis).

D. Évaluation pharmacodynamique

Les NPs contenant des molécules anticancéreuses ont été évaluées chez la souris. Pour cela, un modèle de souris avec un glioblastome a été développé par l'équipe de la Dre Erika Cosset au CRCL. Pour cela, des souris femelles Nude (Charles River, France) ont été anesthésiées avec de la kétamine et de la xylazine (Rompun, Centravet, France) par voie intrapéritonéale et de la buprénorphine comme analgésique par voie sous cutanée. Les souris sont positionnées dans l'appareil de stéréotaxie. Une incision de l'os occipital à l'os frontal est réalisée à l'aide d'un scalpel et une goutte de lidocaïne est ajoutée. Le site d'injection se situe à 2,6 mm du bregma, au-dessus de l'os frontal gauche. L'aiguille est positionnée au-dessus de l'os frontal gauche et insérée de 1,6 mm. Une seringue Hamilton est attachée à l'aiguille et cette aiguille est abaissée à 3,6 mm dans le cerveau puis retirée de 0,2 mm afin de créer une poche pour les cellules. Puis les cellules sont injectées avec un débit de 0,5 μL toutes les 30 secondes (2500 cellules dans un volume de 2 μL). Puis l'aiguille est retirée lentement de

0,5 mm toutes les 30 secondes. L'incision est ligaturée avec un point de suture. La souris est ensuite placée sur un tapis chauffant lors de son réveil.

Les cellules implantées sont des cellules issues de biopsies de patients (prélèvement GSC Ge904) qui ont été transfectées avec de la GFP-Luciférase. Cette transfection permet de visualiser la tumeur grâce à la bioluminescence.

Une fois la tumeur implantée et d'une taille suffisante, les traitements sont administrés par voie intranasale. Les souris sont anesthésiées avec 3,5 % d'isoflurane puis un volume de 10 μ L de NPs sont administrées avec une micropipette dans chacune des narines, la souris est remplacée sous isoflurane et une deuxième administration est réalisée. Le suivi des souris se fait par imagerie en bioluminescence (PhotonImager RT, BioSpace Lab, France) , par évaluation des atteintes neurologiques (crises d'épilepsie, comportement anormal, animal prostré) et par mesure du poids des souris. L'efficacité du traitement est visualisée par la mesure de la survie des animaux.

V. Statistiques

Dans l'ensemble du manuscrit l'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel GraphPad Prism 10.1.1 (Etats-Unis). Les tests statistiques sont précisés dans la légende des figures. Lorsque des tests paramétriques sont utilisés, la normalité a été vérifiée. Les résultats de l'analyse statistique ainsi que les différences obtenues sont indiqués dans les figures.

ANNEXES

PUBLICATIONS

- Revue : **Bolon, M.**, Fieux, M., Monge, C., & Richard, S. (2025). Polymeric nanoparticles for efficient nose-to-brain delivery. *Nanoscale*, 17(31), 17947–17979. <https://doi.org/10.1039/d5nr00870k>
- Article : **Bolon, M.**, Marie, M., Megy, S., Petrakis, R., Terreux, R., Fieux, M., Monge, C., & Richard, S. (2025). Polymeric nanoparticles as a platform for nose-to-brain delivery. *Journal of materials chemistry. B*, 10.1039/d5tb00947b. Advance online publication. <https://doi.org/10.1039/d5tb00947b>

COMMUNICATIONS ORALES

- Journée de l'École Doctorale EDISS : novembre 2024 (Lyon)
Nasal administration of nanoformulations for nose-to-brain delivery
- SF Nano : décembre 2024 (Toulouse)
Nanoformulations for nose-to-brain delivery and the treatment of the Alzheimer's Disease
- Présentation à la journée de la SFR Biosciences : juin 2025 (Lyon)
Nanoformulations for the nose-to-brain delivery and their monitoring using imaging systems

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

- SF Nano Junior : juin 2023 (Paris)
Optimization of poloxamers-PLA nanoparticles for imaging the nose-to-brain delivery
- SF Nano : décembre 2023 (Montpellier)
Polymeric nanoparticles as a platform for nose-to-brain delivery imaging and drug delivery

ÉVÉNEMENTS DE VULGARISATION SCIENTIFIQUE

- Fête de la science : 2023 & 2024, préparation d'atelier de formulations d'hydrogels et de nanoparticules

ACTIVITES D'ENCADREMENT

- Stagiaires de Master 2
 - Morgane MARIE (Master 2 ; Sciences du médicament), 2024

Morgane a participé à la caractérisation des NPs dans les milieux biologiques artificiels tels que le mucus ou le liquide céphalo-rachidien. Elle a également réalisé la viabilité des RPMI

2650 en présence de formulations sans BP, ni agents d'imagerie. Elle a également participé à la mise au point de l'internalisation des NPs fluorescentes par les RPMI 2650 en microscopie confocale. Elle a participé à l'évaluation de la biodistribution via le FMT de Perkin Elmer (les données ne sont pas montrées dans ce manuscrit). Elle a également réalisé des coupes de cavités nasales et des marquages par immunofluorescence après administration IN de NPs fluorescentes sans BP.

- Audrey BARBEREAU (Master 2 : Sciences du médicament), 2025

Audrey a réalisé l'évaluation de la stabilité des NP-PLA-P188-BP, l'ensemble des formulations pour les évaluations de l'activité du BP et de la capacité de protection des NPs, ainsi que les mesures de la viabilité des RPMI 2650 et des PC12 différenciées en présence de ces NPs. Elle a également réalisé les expériences de cytométrie en flux, la biodistribution sur l'appareil Kaer Labs, des coupes et marquages de cavités nasales de souris qui ont reçu les NP-PLA-P188-BP et les NP-PLA-P188 fluorescentes. Elle a aussi réalisé des coupes et marquages de cerveaux de souris ayant reçu toutes les formulations fluorescentes.

AUTRES ACTIVITES

- Participation à différents tournages vidéo :
 - Vidéo de présentation de la Dre Claire Monge, lors de l'obtention de sa médaille de Bronze du CNRS
<https://www.youtube.com/watch?v=mY3c1V7qfPk&list=PLtdnzmHs5NRwCRQzbV0ANjYCjBeThqruk&index=24>
 - Vidéo de présentation du microscope à feuillets de lumière de la plateforme Platim de la SFR Biosciences
 - Vidéo de présentation de la fête de la science dans le cadre de l'unité d'enseignement Communication scientifique du master 1 Biosciences de l'Université Claude Bernard Lyon 1
- Participation à l'organisation de la retraite du laboratoire (hébergement, transports, programme scientifique, activités de cohésion d'équipe...) : 2023 & 2025

BIBLIOGRAPHIE

1. Huang Q, Chen X, Yu S, Gong G, Shu H. Research progress in brain-targeted nasal drug delivery. *Front Aging Neurosci.* 2024 Jan 17;15.
2. Le cerveau malade et ses maladies neurologiques [Internet]. Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC). 2023 [cited 2023 Aug 28]. Available from: <https://www.frcneurodon.org/comprendre-le-cerveau/le-cerveau-malade-et-ses-maladies-neurologiques/>
3. Ahmadian-Moghadam H, Sadat-Shirazi MS, Zarrindast MR. Therapeutic potential of stem cells for treatment of neurodegenerative diseases. *Biotechnol Lett.* 2020 Jul;42(7):1073–101.
4. Antunes JL, Amado J, Veiga F, Paiva-Santos AC, Pires PC. Nanosystems, Drug Molecule Functionalization and Intranasal Delivery: An Update on the Most Promising Strategies for Increasing the Therapeutic Efficacy of Antidepressant and Anxiolytic Drugs. *Pharmaceutics.* 2023 Mar 20;15(3):998.
5. Tatulian SA. Challenges and hopes for Alzheimer's disease. *Drug Discov Today.* 2022 Apr;27(4):1027–43.
6. Daneman R, Prat A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Jan;7(1):a020412.
7. Partridge B, Eardley A, Morales BE, Campelo SN, Lorenzo MF, Mehta JN, et al. Advancements in drug delivery methods for the treatment of brain disease. *Front Vet Sci.* 2022 Oct 18;9:1039745.
8. Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 May 15;64(7):614–28.
9. Pandit R, Chen L, Götz J. The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020 Jan 1;165–166:1–14.
10. Clinical Trials register - Search for brain AND intranasal [Internet]. [cited 2025 Nov 3]. Available from: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=brain+AND+intranasal>
11. Search ClinicalTrials.gov for: brain, Other terms: Intranasal Administration | Card Results | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2025 Nov 3]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/search>
12. Hu X, Yue X, Wu C, Zhang X. Factors affecting nasal drug delivery and design strategies for intranasal drug delivery. *Zhejiang Xue Xue Bao Yi Xue Ban J Zhejiang Univ Med Sci.* 2023 Jun 25;52(3):328–37.
13. Maher R, Moreno-Borralló A, Jindal D, Mai BT, Ruiz-Hernandez E, Harkin A. Intranasal Polymeric and Lipid-Based Nanocarriers for CNS Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 2023 Feb 23;15(3):746.
14. Rust R, Yin H, Achón Buil B, Sagare AP, Kisler K. The blood-brain barrier: a help and a hindrance. *Brain J Neurol.* 2025 Jul 7;148(7):2262–82.
15. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010 Jan 1;37(1):13–25.
16. Langen UH, Ayloo S, Gu C. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2019 Oct 6;35:591–613.
17. Lin J, Yu Z, Gao X. Advanced Noninvasive Strategies for the Brain Delivery of Therapeutic Proteins and Peptides. *ACS Nano.* 2024 Aug 27;18(34):22752–79.
18. Crowe TP, Hsu WH. Evaluation of Recent Intranasal Drug Delivery Systems to the Central Nervous System. *Pharmaceutics.* 2022 Mar 12;14(3):629.
19. Escada PA, Lima C, da Silva JM. The human olfactory mucosa. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg.* 2009 Nov;266(11):1675–80.
20. Gänger S, Schindowski K. Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics.* 2018 Sep;10(3):116.
21. Yokel RA. Direct nose to the brain nanomedicine delivery presents a formidable challenge. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2022 Mar;14(2):e1767.
22. Tan MSA, Parekh HS, Pandey P, Siskind DJ, Falconer JR. Nose-to-brain delivery of antipsychotics using nanotechnology: a review. *Expert Opin Drug Deliv.* 2020 Jun;17(6):839–53.
23. Pardeshi CV, Belgamwar VS. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways

- bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013 Jul;10(7):957–72.
24. Wang B, Wang Q, Chen H, Zhou X, Wang H, Wang H, et al. Size-Dependent Translocation Pattern, Chemical and Biological Transformation of Nano- and Submicron-Sized Ferric Oxide Particles in the Central Nervous System. *J Nanosci Nanotechnol.* 2016 Jun;16(6):5553–61.
25. Tanaka A, Furubayashi T, Arai M, Inoue D, Kimura S, Kiriya A, et al. Delivery of Oxytocin to the Brain for the Treatment of Autism Spectrum Disorder by Nasal Application. *Mol Pharm.* 2018 Mar 5;15(3):1105–11.
26. Taléns-Visconti R, de Julián-Ortiz JV, Vila-Busó O, Díez-Sales O, Nacher A. Intranasal Drug Administration in Alzheimer-Type Dementia: Towards Clinical Applications. *Pharmaceutics.* 2023 May 3;15(5):1399.
27. Jeong SH, Jang JH, Lee YB. Drug delivery to the brain via the nasal route of administration: exploration of key targets and major consideration factors. *J Pharm Investig.* 2023;53(1):119–52.
28. Ugwoke MI, Verbeke N, Kinget R. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *J Pharm Pharmacol.* 2001 Jan;53(1):3–21.
29. Cherait A, Banks WA, Vaudry D. The Potential of the Nose-to-Brain Delivery of PACAP for the Treatment of Neuronal Disease. *Pharmaceutics.* 2023 Jul 28;15(8):2032.
30. Nigam K, Kaur A, Tyagi A, Manda K, Goswami N, Nematullah M, et al. In vitro & in vivo evaluations of PLGA nanoparticle based combinatorial drug therapy for baclofen and lamotrigine for neuropathic pain management. *J Microencapsul.* 2022 Mar;39(2):95–109.
31. Costa C, Moreira JN, Amaral MH, Sousa Lobo JM, Silva AC. Nose-to-brain delivery of lipid-based nanosystems for epileptic seizures and anxiety crisis. *J Controlled Release.* 2019 Feb 10;295:187–200.
32. Madden S, Carrazana E, Rabinowicz AL. Optimizing Absorption for Intranasal Delivery of Drugs Targeting the Central Nervous System Using Alkylsaccharide Permeation Enhancers. *Pharmaceutics.* 2023 Aug 10;15(8):2119.
33. Leal J, Smyth HDC, Ghosh D. Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *Int J Pharm.* 2017 Oct 30;532(1):555–72.
34. Kennel C, Gould EA, Larson ED, Salcedo E, Vickery T, Restrepo D, et al. Differential Expression of Mucins in Murine Olfactory Versus Respiratory Epithelium. *Chem Senses.* 2019 Sep 7;44(7):511–21.
35. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest.* 2018 Jul;154(1):169–76.
36. Beule AG. Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2011 Apr 27;9:Doc07.
37. Jiao J, Zhang L. Influence of Intranasal Drugs on Human Nasal Mucociliary Clearance and Ciliary Beat Frequency. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2018 Dec 26;11(3):306–19.
38. Lofts A, Abu-Hijleh F, Rigg N, Mishra RK, Hoare T. Using the Intranasal Route to Administer Drugs to Treat Neurological and Psychiatric Illnesses: Rationale, Successes, and Future Needs. *CNS Drugs.* 2022 Jul;36(7):739–70.
39. Pires A, Fortuna A, Alves G, Falcão A. Intranasal drug delivery: how, why and what for? *J Pharm Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Soc Can Sci Pharm.* 2009;12(3):288–311.
40. Wu H, Hu K, Jiang X. From nose to brain: understanding transport capacity and transport rate of drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2008 Oct;5(10):1159–68.
41. Tai J, Han M, Lee D, Park IH, Lee SH, Kim TH. Different Methods and Formulations of Drugs and Vaccines for Nasal Administration. *Pharmaceutics.* 2022 May;14(5):1073.
42. Fang S, Rui X, Zhang Y, Yang Z, Wang W. Comparative study of nasal cavity drug delivery efficiency with different nozzles in a 3D printed model. *PeerJ.* 2024 Apr 10;12:e17227.
43. Awad R, Avital A, Sosnik A. Polymeric nanocarriers for nose-to-brain drug delivery in neurodegenerative diseases and neurodevelopmental disorders. *Acta Pharm Sin B.* 2023 May;13(5):1866–86.
44. Alshweiat A, Ambrus R, Csóka I. Intranasal Nanoparticulate Systems as Alternative Route of Drug Delivery. *Curr Med Chem.* 2019;26(35):6459–92.
45. Battaglia L, Panciani PP, Muntoni E, Capucchio MT, Biasibetti E, De Bonis P, et al. Lipid nanoparticles for intranasal administration: application to nose-to-brain delivery. 2018 [cited 2025 Mar

17]; Available from: <https://iris.unito.it/handle/2318/1662297>

46. Shah S, Dhawan V, Holm R, Nagarsenker MS, Perrie Y. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020 Jan 1;154–155:102–22.
47. Alberto M, Paiva-Santos AC, Veiga F, Pires PC. Lipid and Polymeric Nanoparticles: Successful Strategies for Nose-to-Brain Drug Delivery in the Treatment of Depression and Anxiety Disorders. *Pharmaceutics.* 2022 Dec 8;14(12):2742.
48. Fatouh AM, Elshafeey AH, Abdelbary A. Intranasal agomelatine solid lipid nanoparticles to enhance brain delivery: formulation, optimization and in vivo pharmacokinetics. *Drug Des Devel Ther.* 2017 Jun 19;11:1815–25.
49. Arya RKK, Vijay J, Bisht D, Rashid M, Alfawaz Altamimi AS, Afzal O, et al. Enhanced Brain Delivery via Intranasal Administration of Carbamazepine Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Optimization, Pharmacokinetic Analysis, In-vitro, and In-vivo Drug Release Study. *Curr Drug Deliv.* 2023;20(5):587–600.
50. Costa CP, Moreira JN, Sousa Lobo JM, Silva AC. Intranasal delivery of nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles and nanoemulsions: A current overview of in vivo studies. *Acta Pharm Sin B.* 2021 Apr;11(4):925–40.
51. Chen Y, Zhang C, Huang Y, Ma Y, Song Q, Chen H, et al. Intranasal drug delivery: The interaction between nanoparticles and the nose-to-brain pathway. *Adv Drug Deliv Rev.* 2024 Apr 1;207:115196.
52. Unnikrishnan G, Joy A, Megha M, Kolanthai E, Senthilkumar M. Exploration of inorganic nanoparticles for revolutionary drug delivery applications: a critical review. *Discov Nano.* 2023 Dec 19;18(1):157.
53. Islam SU, Shehzad A, Ahmed MB, Lee YS. Intranasal Delivery of Nanoformulations: A Potential Way of Treatment for Neurological Disorders. *Mol Basel Switz.* 2020 Apr 21;25(8):1929.
54. Mubarak N, Waqar MA, Khan AM, Asif Z, Alvi AS, Virk AA, et al. A comprehensive insight of innovations and recent advancements in nanocarriers for nose-to-brain drug targeting. *Des Monomers Polym.* 2025;28(1):7–29.
55. Hopkins LE, Patchin ES, Chiu PL, Brandenberger C, Smiley-Jewell S, Pinkerton KE. Nose-to-Brain Transport of Aerosolized Quantum Dots Following Acute Exposure. *Nanotoxicology.* 2014 Dec;8(8):885–93.
56. Kou D, Gao Y, Li C, Zhou D, Lu K, Wang N, et al. Intranasal Pathway for Nanoparticles to Enter the Central Nervous System. *Nano Lett.* 2023 Jun 14;23(11):5381–90.
57. Venditti I. Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review. *J King Saud Univ - Sci.* 2019 Jul 1;31(3):398–411.
58. Katare YK, Daya RP, Sookram Gray C, Luckham RE, Bhandari J, Chauhan AS, et al. Brain Targeting of a Water Insoluble Antipsychotic Drug Haloperidol via the Intranasal Route Using PAMAM Dendrimer. *Mol Pharm.* 2015 Sep 8;12(9):3380–8.
59. Schlachet I, Moshe Halamish H, Sosnik A. Mixed Amphiphilic Polymeric Nanoparticles of Chitosan, Poly(vinyl alcohol) and Poly(methyl methacrylate) for Intranasal Drug Delivery: A Preliminary In Vivo Study. *Molecules.* 2020 Sep 30;25(19):4496.
60. Jiang Y, Chen J, Deng C, Suuronen EJ, Zhong Z. Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 2014 Jun 1;35(18):4969–85.
61. Picone P, Sabatino MA, Ditta LA, Amato A, San Biagio PL, Mulè F, et al. Nose-to-brain delivery of insulin enhanced by a nanogel carrier. *J Controlled Release.* 2018 Jan 28;270:23–36.
62. Bruinsmann FA, de Cristo Soares Alves A, de Fraga Dias A, Lopes Silva LF, Visioli F, Raffin Pohlmann A, et al. Nose-to-brain delivery of simvastatin mediated by chitosan-coated lipid-core nanocapsules allows for the treatment of glioblastoma *in vivo*. *Int J Pharm.* 2022 Mar 25;616:121563.
63. Frigaard J, Jensen JL, Galtung HK, Hiorth M. The Potential of Chitosan in Nanomedicine: An Overview of the Cytotoxicity of Chitosan Based Nanoparticles. *Front Pharmacol.* 2022;13:880377.
64. Iqbal Y, Ahmed I, Irfan MF, Chatha SAS, Zubair M, Ullah A. Recent advances in chitosan-based materials; The synthesis, modifications and biomedical applications. *Carbohydr Polym.* 2023 Dec 1;321:121318.

65. Rezaei N, Zarkesh I, Fotouhi A, Alikhani HK, Hassan M, Vosough M. Chitosan-coated nanoparticles in innovative cancer bio-medicine. *Drug Dev Res.* 2024 May;85(3):e22189.
66. Ma J, Wang Y, Lu R. Mechanism and Application of Chitosan and Its Derivatives in Promoting Permeation in Transdermal Drug Delivery Systems: A Review. *Pharmaceuticals.* 2022 Apr 10;15(4):459.
67. Qureshi M, Aqil M, Imam SS, Ahad A, Sultana Y. Formulation and Evaluation of Neuroactive Drug Loaded Chitosan Nanoparticle for Nose to Brain Delivery: In-vitro Characterization and In-vivo Behavior Study. *Curr Drug Deliv.* 2019;16(2):123–35.
68. Sunena null, Singh SK, Mishra DN. Nose to Brain Delivery of Galantamine Loaded Nanoparticles: In-vivo Pharmacodynamic and Biochemical Study in Mice. *Curr Drug Deliv.* 2019;16(1):51–8.
69. Yu S, Xu X, Feng J, Liu M, Hu K. Chitosan and chitosan coating nanoparticles for the treatment of brain disease. *Int J Pharm.* 2019 Apr 5;560:282–93.
70. Bhattamisra SK, Shak AT, Xi LW, Safian NH, Choudhury H, Lim WM, et al. Nose to brain delivery of rotigotine loaded chitosan nanoparticles in human SH-SY5Y neuroblastoma cells and animal model of Parkinson's disease. *Int J Pharm.* 2020 Apr 15;579:119148.
71. Shukr MH, Farid OAA. Brain targeting of agomelatine egg lecithin based chitosan coated nanoemulsion. *Pharm Dev Technol.* 2021 Apr;26(4):464–75.
72. Uppuluri CT, Ravi PR, Dalvi AV. Design and evaluation of thermo-responsive nasal in situ gelling system dispersed with piribedil loaded lecithin-chitosan hybrid nanoparticles for improved brain availability. *Neuropharmacology.* 2021 Dec 15;201:108832.
73. Ahmad S, Khan I, Pandit J, Emad NA, Bano S, Dar KI, et al. Brain targeted delivery of carmustine using chitosan coated nanoparticles via nasal route for glioblastoma treatment. *Int J Biol Macromol.* 2022 Nov 30;221:435–45.
74. Cunha A, Gaubert A, Latxague L, Dehay B. PLGA-Based Nanoparticles for Neuroprotective Drug Delivery in Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutics.* 2021 Jul 8;13(7):1042.
75. Shakya AK, Al-Sulaibi M, Naik RR, Nsairat H, Suboh S, Abulaila A. Review on PLGA Polymer Based Nanoparticles with Antimicrobial Properties and Their Application in Various Medical Conditions or Infections. *Polymers [Internet].* 2023 Sep [cited 2023 Sep 25];15(17). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10490122/>
76. Chu L, Wang A, Ni L, Yan X, Song Y, Zhao M, et al. Nose-to-brain delivery of temozolomide-loaded PLGA nanoparticles functionalized with anti-EPHA3 for glioblastoma targeting. *Drug Deliv.* 2018 Sep 3;25(1):1634–41.
77. Musumeci T, Di Benedetto G, Carbone C, Bonaccorso A, Amato G, Lo Faro MJ, et al. Intranasal Administration of a TRAIL Neutralizing Monoclonal Antibody Adsorbed in PLGA Nanoparticles and NLC Nanosystems: An In Vivo Study on a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Biomedicines.* 2022 Apr 23;10(5):985.
78. de Oliveira MA, Araújo RS, Mosqueira VCF. PEGylated and functionalized polylactide-based nanocapsules: An overview. *Int J Pharm.* 2023 Apr 5;636:122760.
79. Lee BK, Yun Y, Park K. PLA Micro- and Nano-Particles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Dec 15;107:176–91.
80. Musumeci T, Pellitteri R, Spatuzza M, Puglisi G. Nose-to-brain delivery: evaluation of polymeric nanoparticles on olfactory ensheathing cells uptake. *J Pharm Sci.* 2014 Feb;103(2):628–35.
81. Veronesi MC, Aldouby Y, Domb AJ, Kubek MJ. Thyrotropin-releasing hormone d,l polylactide nanoparticles (TRH-NPs) protect against glutamate toxicity in vitro and kindling development in vivo. *Brain Res.* 2009 Nov 25;1303:151–60.
82. Jain DS, Bajaj AN, Athawale RB, Shikhande SS, Pandey A, Goel PN, et al. Thermosensitive PLA based nanodispersion for targeting brain tumor via intranasal route. *Mater Sci Eng C.* 2016 Jun 1;63:411–21.
83. Gou M, Wei X, Men K, Wang B, Luo F, Zhao X, et al. PCL/PEG copolymeric nanoparticles: potential nanoplatfroms for anticancer agent delivery. *Curr Drug Targets.* 2011 Jul 1;12(8):1131–50.
84. Sawant K, Pandey A, Patel S. Aripiprazole loaded poly(caprolactone) nanoparticles: Optimization and in vivo pharmacokinetics. *Mater Sci Eng C.* 2016 Sep 1;66:230–43.

85. Sorrentino A, Cataldo A, Curatolo R, Tagliatesta P, Mosca L, Bellucci S. Novel optimized biopolymer-based nanoparticles for nose-to-brain delivery in the treatment of depressive diseases. *RSC Adv.* 2020 Aug 3;10(48):28941–9.
86. Mistry A, Glud SZ, Kjemis J, Randel J, Howard KA, Stolnik S, et al. Effect of physicochemical properties on intranasal nanoparticle transit into murine olfactory epithelium. *J Drug Target.* 2009 Aug 1;17(7):543–52.
87. Elmowafy M, Shalaby K, Elkomy MH, Alsaidan OA, Gomaa HAM, Abdelgawad MA, et al. Polymeric Nanoparticles for Delivery of Natural Bioactive Agents: Recent Advances and Challenges. *Polymers.* 2023 Feb 23;15(5):1123.
88. Heinz H, Pramanik C, Heinz O, Ding Y, Mishra RK, Marchon D, et al. Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications. *Surf Sci Rep.* 2017 Feb 1;72(1):1–58.
89. Miyazawa T, Itaya M, Burdeos GC, Nakagawa K, Miyazawa T. A Critical Review of the Use of Surfactant-Coated Nanoparticles in Nanomedicine and Food Nanotechnology. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:3937–99.
90. Shaban SM, Kang J, Kim DH. Surfactants: Recent advances and their applications. *Compos Commun.* 2020 Dec 1;22:100537.
91. Hartl N, Adams F, Merkel OM. From adsorption to covalent bonding: Apolipoprotein E functionalization of polymeric nanoparticles for drug delivery across the blood-brain barrier. *Adv Ther.* 2021 Jan;4(1):2000092.
92. Tiwari S, Kansara V, Bahadur P. Targeting anticancer drugs with pluronic aggregates: Recent updates. *Int J Pharm.* 2020 Aug 30;586:119544.
93. Santander-Ortega MJ, Jódar-Reyes AB, Csaba N, Bastos-González D, Ortega-Vinuesa JL. Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms. *J Colloid Interface Sci.* 2006 Oct 15;302(2):522–9.
94. Yang M, Lai SK, Wang YY, Zhong W, Happe C, Zhang M, et al. Biodegradable Nanoparticles Composed Entirely of Safe Materials that Rapidly Penetrate Human Mucus. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011 Mar 7;50(11):2597–600.
95. Moya ELJ, Lombardo SM, Vandenhaute E, Schneider M, Mysiorek C, Türelí AE, et al. Interaction of surfactant coated PLGA nanoparticles with in vitro human brain-like endothelial cells. *Int J Pharm.* 2022 Jun 10;621:121780.
96. Clementino AR, Pellegrini G, Banella S, Colombo G, Cantù L, Sonvico F, et al. Structure and Fate of Nanoparticles Designed for the Nasal Delivery of Poorly Soluble Drugs. *Mol Pharm.* 2021 Aug 2;18(8):3132–46.
97. Tao X, Mao S, Zhang Q, Yu H, Li Y, He X, et al. Brain-Targeted Polysorbate 80-Emulsified Donepezil Drug-Loaded Nanoparticles for Neuroprotection. *Nanoscale Res Lett.* 2021 Aug 18;16:132.
98. Choudhury H, Gorain B, Pandey M, Kumbhar SA, Tekade RK, Iyer AK, et al. Recent advances in TPGS-based nanoparticles of docetaxel for improved chemotherapy. *Int J Pharm.* 2017 Aug 30;529(1–2):506–22.
99. Lu Y, Wang JTW, Li N, Zhu X, Li Y, Bansal S, et al. Intranasal administration of edaravone nanoparticles improves its stability and brain bioavailability. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2023 Jun 13;359:257–67.
100. Wünsch A, Mulac D, Langer K. Lecithin coating as universal stabilization and functionalization strategy for nanosized drug carriers to overcome the blood–brain barrier. *Int J Pharm.* 2021 Jan 25;593:120146.
101. Gajbhiye KR, Salve R, Narwade M, Sheikh A, Kesharwani P, Gajbhiye V. Lipid polymer hybrid nanoparticles: a custom-tailored next-generation approach for cancer therapeutics. *Mol Cancer.* 2023 Oct 3;22:160.
102. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Apr 1;99(Pt A):28–51.
103. Liu Z, Jiang M, Kang T, Miao D, Gu G, Song Q, et al. Lactoferrin-modified PEG-co-PCL nanoparticles for enhanced brain delivery of NAP peptide following intranasal administration.

Biomaterials. 2013 May 1;34(15):3870–81.

104. Kozma GT, Shimizu T, Ishida T, Szebeni J. Anti-PEG antibodies: Properties, formation, testing and role in adverse immune reactions to PEGylated nano-biopharmaceuticals. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020 Jan 1;154–155:163–75.

105. Bianchi A, Bottau P, Calamelli E, Caimmi S, Crisafulli G, Franceschini F, et al. Hypersensitivity to polyethylene glycol in adults and children: An emerging challenge. *Acta Bio Medica Atenei Parm*. 2021;92(Suppl 7):e2021519.

106. Chatzitaki AT, Jesus S, Karavasili C, Andreadis D, Fatouros DG, Borges O. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for the nasal delivery of ropinirole hydrochloride: In vitro and ex vivo evaluation of efficacy and safety. *Int J Pharm*. 2020 Nov 15;589:119776.

107. Iqbal H, Razzaq A, Khan NU, Rehman SU, Webster TJ, Xiao R, et al. pH-responsive albumin-coated biopolymeric nanoparticles with lapatinab for targeted breast cancer therapy. *Biomater Adv*. 2022 Aug 1;139:213039.

108. Luppi B, Bigucci F, Cerchiara T, Mandrioli R, Di Pietra AM, Zecchi V. New environmental sensitive system for colon-specific delivery of peptidic drugs. *Int J Pharm*. 2008 Jun 24;358(1–2):44–9.

109. Spada A, Emami J, Tuszyński JA, Lavasanifar A. The Uniqueness of Albumin as a Carrier in Nanodrug Delivery. *Mol Pharm*. 2021 May 3;18(5):1862–94.

110. VIDAL [Internet]. 2025 [cited 2025 Oct 29]. ABRAXANE 5 mg/ml pdre p dispersion inj p perf. Available from: <https://www.vidal.fr/medicaments/abraxane-5-mg-ml-pdre-p-dispersion-inj-p-perf-84573.html>

111. Sekerdag E, Lüle S, Bozdağ Pehlivan S, Öztürk N, Kara A, Kaffashi A, et al. A potential non-invasive glioblastoma treatment: Nose-to-brain delivery of farnesylthiosalicylic acid incorporated hybrid nanoparticles. *J Controlled Release*. 2017 Sep 10;261:187–98.

112. Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011;3(1):89–100.

113. Seyam S, Choukaife H, Al Rahal O, Alfatama M. Colonic targeting insulin-loaded trimethyl chitosan nanoparticles coated pectin for oral delivery: In vitro and In vivo studies. *Int J Biol Macromol*. 2024 Oct 12;281(Pt 4):136549.

114. Arruda DC, Gonzalez IJ, Finet S, Cordova L, Trichet V, Andrade GF, et al. Modifying internal organization and surface morphology of siRNA lipoplexes by sodium alginate addition for efficient siRNA delivery. *J Colloid Interface Sci*. 2019 Mar 22;540:342–53.

115. Alawdi S, Solanki AB. Mucoadhesive Drug Delivery Systems: A Review of Recent Developments. *J Sci Res Med Biol Sci*. 2021 Feb 28;2(1):50–64.

116. Brannigan RP, Khutoryanskiy VV. Progress and Current Trends in the Synthesis of Novel Polymers with Enhanced Mucoadhesive Properties. *Macromol Biosci*. 2019 Oct;19(10):e1900194.

117. Singh D, Rashid M, Hallan SS, Mehra NK, Prakash A, Mishra N. Pharmacological evaluation of nasal delivery of selegiline hydrochloride-loaded thiolated chitosan nanoparticles for the treatment of depression. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol*. 2016 Apr 2;44(3):865–77.

118. Gao X, Tao W, Lu W, Zhang Q, Zhang Y, Jiang X, et al. Lectin-conjugated PEG–PLA nanoparticles: Preparation and brain delivery after intranasal administration. *Biomaterials*. 2006 Jun 1;27(18):3482–90.

119. Gao X, Xiong Y, Chen H, Gao X, Dai J, Zhang Y, et al. Mucus adhesion vs. mucus penetration? Screening nanomaterials for nasal inhalation by MD simulation. *J Controlled Release*. 2023 Jan 1;353:366–79.

120. Laffleur F, Bernkop-Schnürch A. Strategies for improving mucosal drug delivery. *Nanomed*. 2013 Dec;8(12):2061–75.

121. Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, Hsu WH. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci*. 2018 Feb 15;195:44–52.

122. Chen J, Zhang C, Liu Q, Shao X, Feng C, Shen Y, et al. *Solanum tuberosum* lectin-conjugated PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: *in vivo* and *in vitro* evaluations. *J Drug Target*. 2012 Feb;20(2):174–84.

123. Reissmann S, Filatova MP. New generation of cell-penetrating peptides: Functionality and

potential clinical application. *J Pept Sci Off Publ Eur Pept Soc.* 2021 May;27(5):e3300.

124. Kanazawa T, Taki H, Tanaka K, Takashima Y, Okada H. Cell-penetrating peptide-modified block copolymer micelles promote direct brain delivery via intranasal administration. *Pharm Res.* 2011 Sep;28(9):2130–9.

125. Xia H, Gao X, Gu G, Liu Z, Zeng N, Hu Q, et al. Low molecular weight protamine-functionalized nanoparticles for drug delivery to the brain after intranasal administration. *Biomaterials.* 2011 Dec 1;32(36):9888–98.

126. Sharma S, Tyagi A, Dang S. Nose to Brain Delivery of Transferrin conjugated PLGA nanoparticles for clonidine. *Int J Biol Macromol.* 2023 Dec 1;252:126471.

127. Pan L, Zhou J, Ju F, Zhu H. Intranasal delivery of α -asarone to the brain with lactoferrin-modified mPEG-PLA nanoparticles prepared by premix membrane emulsification. *Drug Deliv Transl Res.* 2018 Feb;8(1):83–96.

128. Chung EP, Cotter JD, Prakapenka AV, Cook RL, DiPerna DM, Sirianni RW. Targeting Small Molecule Delivery to the Brain and Spinal Cord via Intranasal Administration of Rabies Virus Glycoprotein (RVG29)-Modified PLGA Nanoparticles. *Pharmaceutics.* 2020 Jan 24;12(2):93.

129. Salatin S, Maleki Dizaj S, Yari Khosroushahi A. Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. *Cell Biol Int.* 2015 Aug;39(8):881–90.

130. Gandhi S, Shastri DH, Shah J, Nair AB, Jacob S. Nasal Delivery to the Brain: Harnessing Nanoparticles for Effective Drug Transport. *Pharmaceutics.* 2024 Apr 1;16(4):481.

131. Sonvico F, Clementino A, Buttini F, Colombo G, Pescina S, Stanisquaski Guterres S, et al. Surface-Modified Nanocarriers for Nose-to-Brain Delivery: From Bioadhesion to Targeting. *Pharmaceutics.* 2018 Mar;10(1):34.

132. Kanazawa T, Taki H, Okada H. Nose-to-brain drug delivery system with ligand/cell-penetrating peptide-modified polymeric nano-micelles for intracerebral gliomas. *Eur J Pharm Biopharm.* 2020 Jul 1;152:85–94.

133. Veronesi MC, Graner BD, Cheng SH, Zamora M, Zarrinmayeh H, Chen CT, et al. Aerosolized In Vivo 3D Localization of Nose-to-Brain Nanocarrier Delivery Using Multimodality Neuroimaging in a Rat Model—Protocol Development. *Pharmaceutics.* 2021 Mar 15;13(3):391.

134. Seju U, Kumar A, Sawant KK. Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies. *Acta Biomater.* 2011 Dec 1;7(12):4169–76.

135. Ahmad N, Ahmad R, Naqvi AA, Alam MA, Ashafaq M, Samim M, et al. Rutin-encapsulated chitosan nanoparticles targeted to the brain in the treatment of Cerebral Ischemia. *Int J Biol Macromol.* 2016 Oct 1;91:640–55.

136. Cruz LJ, Stammes MA, Que I, van Beek ER, Knol-Blanckevoort VT, Snoeks TJA, et al. Effect of PLGA NP size on efficiency to target traumatic brain injury. *J Controlled Release.* 2016 Feb 10;223:31–41.

137. Guo T, Guo Y, Gong Y, Ji J, Hao S, Deng J, et al. An enhanced charge-driven intranasal delivery of nicardipine attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage. *Int J Pharm.* 2019 Jul 20;566:46–56.

138. Alex AT, Joseph A, Shavi G, Rao JV, Udupa N. Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery. *Drug Deliv.* 2016 Sep;23(7):2144–53.

139. Mosquera J, García I, Liz-Marzán LM. Cellular Uptake of Nanoparticles versus Small Molecules: A Matter of Size. *Acc Chem Res.* 2018 Sep 18;51(9):2305–13.

140. Toscano F, Torres-Arias M. Nanoparticles cellular uptake, trafficking, activation, toxicity and in vitro evaluation. *Curr Res Immunol.* 2023 Nov 9;4:100073.

141. Beach MA, Nayanathara U, Gao Y, Zhang C, Xiong Y, Wang Y, et al. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Chem Rev.* 2024 May 8;124(9):5505–616.

142. Gartzandia O, Egusquiaguirre SP, Bianco J, Pedraz JL, Igartua M, Hernandez RM, et al. Nanoparticle transport across in vitro olfactory cell monolayers. *Int J Pharm.* 2016 Feb 29;499(1):81–9.

143. Bonaccorso A, Musumeci T, Serapide MF, Pellitteri R, Uchegbu IF, Puglisi G. Nose to brain

- delivery in rats: Effect of surface charge of rhodamine B labeled nanocarriers on brain subregion localization. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017 Jun 1;154:297–306.
144. Muntimadugu E, Dhommatti R, Jain A, Challa VGS, Shaheen M, Khan W. Intranasal delivery of nanoparticle encapsulated tarenflurbil: A potential brain targeting strategy for Alzheimer's disease. *Eur J Pharm Sci*. 2016 Sep 20;92:224–34.
 145. Rukmangathen R, Yallamalli IM, Yalavarthi PR. Biopharmaceutical Potential of Selegiline Loaded Chitosan Nanoparticles in the Management of Parkinson's Disease. *Curr Drug Discov Technol*. 2019;16(4):417–25.
 146. Wei X, Shao B, He Z, Ye T, Luo M, Sang Y, et al. Cationic nanocarriers induce cell necrosis through impairment of Na⁺/K⁺-ATPase and cause subsequent inflammatory response. *Cell Res*. 2015 Feb;25(2):237–53.
 147. Sakurai F, Nishioka T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M. Effects of erythrocytes and serum proteins on lung accumulation of lipoplexes containing cholesterol or DOPE as a helper lipid in the single-pass rat lung perfusion system. *Eur J Pharm Biopharm*. 2001 Sep 1;52(2):165–72.
 148. Moghimi SM, Simberg D. Pro-inflammatory concerns with lipid nanoparticles. *Mol Ther*. 2022 Jun 1;30(6):2109–10.
 149. Erdő F, Bors LA, Farkas D, Bajza Á, Gizurarson S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Res Bull*. 2018 Oct 1;143:155–70.
 150. Sakagami M. In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006 Oct 31;58(9):1030–60.
 151. Schlachet I, Sosnik A. Mixed Mucoadhesive Amphiphilic Polymeric Nanoparticles Cross a Model of Nasal Septum Epithelium in Vitro. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 Jun 19;11(24):21360–71.
 152. Oprea D, Sanz CG, Barsan MM, Enache TA. PC-12 Cell Line as a Neuronal Cell Model for Biosensing Applications. *Biosensors*. 2022 Jul 8;12(7):500.
 153. Zeng Z, Xu J, Zheng W. Artemisinin protects PC12 cells against β -amyloid-induced apoptosis through activation of the ERK1/2 signaling pathway. *Redox Biol*. 2017 Apr 4;12:625–33.
 154. Zhao X, Sun L, Wang J, Xu X, Ni S, Liu M, et al. Nose to brain delivery of Astragaloside IV by β -Asarone modified chitosan nanoparticles for multiple sclerosis therapy. *Int J Pharm*. 2023 Sep 25;644:123351.
 155. Stansley B, Post J, Hensley K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2012 May 31;9:115.
 156. Silva S, Bicker J, Falcão A, Fortuna A. Air-liquid interface (ALI) impact on different respiratory cell cultures. *Eur J Pharm Biopharm*. 2023 Mar 1;184:62–82.
 157. Reichl S, Becker K. Cultivation of RPMI 2650 cells as an in-vitro model for human transmucosal nasal drug absorption studies: optimization of selected culture conditions. *J Pharm Pharmacol*. 2012 Nov 1;64(11):1621–30.
 158. Bai S, Yang T, Abbruscato TJ, Ahsan F. Evaluation of human nasal RPMI 2650 cells grown at an air-liquid interface as a model for nasal drug transport studies. *J Pharm Sci*. 2008 Mar;97(3):1165–78.
 159. Gabold B, Adams F, Brameyer S, Jung K, Ried CL, Merdan T, et al. Transferrin-modified chitosan nanoparticles for targeted nose-to-brain delivery of proteins. *Drug Deliv Transl Res*. 2023 Mar 1;13(3):822–38.
 160. Gholizadeh H, Ong HX, Bradbury P, Kourmatzis A, Traini D, Young P, et al. Real-time quantitative monitoring of in vitro nasal drug delivery by a nasal epithelial mucosa-on-a-chip model. *Expert Opin Drug Deliv*. 2021 Jun;18(6):803–18.
 161. Gadhave DG, Quadros M, Ugale AR, Goyal M, Ayehunie S, Gupta V. Mucoadhesive chitosan-poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for intranasal delivery of quetiapine – Development & characterization in physiologically relevant 3D tissue models. *Int J Biol Macromol*. 2024 May 1;267:131491.
 162. Mercier C, Jacqueroix E, He Z, Hodin S, Constant S, Perek N, et al. Pharmacological characterization of the 3D MucilAir™ nasal model. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019 Jun 1;139:186–96.
 163. Craparo EF, Musumeci T, Bonaccorso A, Pellitteri R, Romeo A, Naletova I, et al. mPEG-PLGA

Nanoparticles Labelled with Loaded or Conjugated Rhodamine-B for Potential Nose-to-Brain Delivery. *Pharmaceutics*. 2021 Sep 18;13(9):1508.

164. Ferreira NN, Granja S, Boni FI, Prezotti FG, Ferreira LMB, Cury BSF, et al. Modulating chitosan-PLGA nanoparticle properties to design a co-delivery platform for glioblastoma therapy intended for nose-to-brain route. *Drug Deliv Transl Res*. 2020 Dec;10(6):1729–47.

165. Shi D, Mi G, Wang M, Webster TJ. In vitro and ex vivo systems at the forefront of infection modeling and drug discovery. *Biomaterials*. 2019 Apr;198:228–49.

166. Prior N, Inacio P, Huch M. Liver organoids: from basic research to therapeutic applications. *Gut*. 2019 Dec;68(12):2228–37.

167. Liu J, Zhang Y, Yu Y. Establishment of nasal and olfactory epithelium organoids for unveiling mechanism of tissue regeneration and pathogenesis of nasal diseases. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2025 Jan 3;82(1):33.

168. Senf K, Karius J, Stumm R, Neuhaus EM. Chemokine signaling is required for homeostatic and injury-induced neurogenesis in the olfactory epithelium. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2021 May;39(5):617–35.

169. Merkle HP, Ditzinger G, Lang SR, Peter H, Schmidt MC. In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998 Jan 5;29(1–2):51–79.

170. Mittal D, Md S, Hasan Q, Fazil M, Ali A, Baboota S, et al. Brain targeted nanoparticulate drug delivery system of rasagiline via intranasal route. *Drug Deliv*. 2016;23(1):130–9.

171. Haroon HB, Mukherjee D, Anbu J, Teja BV. Thiolated Chitosan-Centella asiatica Nanocomposite: A Potential Brain Targeting Strategy Through Nasal Route. *AAPS PharmSciTech*. 2021 Oct 19;22(8):251.

172. Badran MM, Alanazi AE, Ibrahim MA, Alshora DH, Taha E, H. Alomrani A. Optimization of Bromocriptine-Mesylate-Loaded Polycaprolactone Nanoparticles Coated with Chitosan for Nose-to-Brain Delivery: In Vitro and In Vivo Studies. *Polymers*. 2023 Sep 26;15(19):3890.

173. Raj R, Wairkar S, Sridhar V, Gaud R. Pramipexole dihydrochloride loaded chitosan nanoparticles for nose to brain delivery: Development, characterization and in vivo anti-Parkinson activity. *Int J Biol Macromol*. 2018 Apr 1;109:27–35.

174. Shah B, Khunt D, Misra M, Padh H. “Application of Box-Behnken design for optimization and development of quetiapine fumarate loaded chitosan nanoparticles for brain delivery via intranasal route*.” *Int J Biol Macromol*. 2016 Aug 1;89:206–18.

175. Shrestha N, Khan S, Neupane YR, Dang S, Md S, Fahmy UA, et al. Tailoring Midazolam-Loaded Chitosan Nanoparticulate Formulation for Enhanced Brain Delivery via Intranasal Route. *Polymers*. 2020 Nov 4;12(11):2589.

176. Javia A, Thakkar H. Intranasal delivery of tapentadol hydrochloride-loaded chitosan nanoparticles: formulation, characterisation and its in vivo evaluation. *J Microencapsul*. 2017 Oct 3;34(7):644–58.

177. Deepika D, Dewangan HK, Maurya L, Singh S. Intranasal Drug Delivery of Frovatriptan Succinate-Loaded Polymeric Nanoparticles for Brain Targeting. *J Pharm Sci*. 2019 Feb;108(2):851–9.

178. Jani P, Vanza J, Pandya N, Tandel H. Formulation of polymeric nanoparticles of antidepressant drug for intranasal delivery. *Ther Deliv*. 2019 Nov;10(11):683–96.

179. Du G, Gao Y, Nie S, Pan W. The permeation of nalmefene hydrochloride across different regions of ovine nasal mucosa. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2006 Dec;54(12):1722–4.

180. Patil GB, Surana SJ. Fabrication and statistical optimization of surface engineered PLGA nanoparticles for naso-brain delivery of ropinirole hydrochloride: in-vitro-ex-vivo studies. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2013;24(15):1740–56.

181. Sharma D, Sharma RK, Sharma N, Gabrani R, Sharma SK, Ali J, et al. Nose-To-Brain Delivery of PLGA-Diazepam Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*. 2015 Feb 21;16(5):1108–21.

182. Sharma D, Maheshwari D, Philip G, Rana R, Bhatia S, Singh M, et al. Formulation and Optimization of Polymeric Nanoparticles for Intranasal Delivery of Lorazepam Using Box-Behnken Design: In Vitro and In Vivo Evaluation. *BioMed Res Int*. 2014;2014:156010.

183. Piazzini V, Landucci E, D’Ambrosio M, Tiozzo Fasiolo L, Cinci L, Colombo G, et al. Chitosan

coated human serum albumin nanoparticles: A promising strategy for nose-to-brain drug delivery. *Int J Biol Macromol*. 2019 May 15;129:267–80.

184. Kumar M, Pandey RS, Patra KC, Jain SK, Soni ML, Dangi JS, et al. Evaluation of neuropeptide loaded trimethyl chitosan nanoparticles for nose to brain delivery. *Int J Biol Macromol*. 2013 Oct 1;61:189–95.

185. Jafarieh O, Md S, Ali M, Baboota S, Sahni JK, Kumari B, et al. Design, characterization, and evaluation of intranasal delivery of ropinirole-loaded mucoadhesive nanoparticles for brain targeting. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015 Oct 3;41(10):1674–81.

186. Fazil M, Md S, Haque S, Kumar M, Baboota S, Sahni JK, et al. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2012 Aug 30;47(1):6–15.

187. Haque S, Md S, Fazil M, Kumar M, Sahni JK, Ali J, et al. Venlafaxine loaded chitosan NPs for brain targeting: Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. *Carbohydr Polym*. 2012 Jun 5;89(1):72–9.

188. Okmen Altas B, Kalaycioglu GD, Lifshiz-Simon S, Talmon Y, Aydogan N. Tadpole-Like Anisotropic Polymer/Lipid Janus Nanoparticles for Nose-to-Brain Drug Delivery: Importance of Geometry, Elasticity on Mucus-Penetration Ability. *Mol Pharm*. 2024 Feb 5;21(2):633–50.

189. Bari NK, Fazil M, Hassan MQ, Haider MR, Gaba B, Narang JK, et al. Brain delivery of buspirone hydrochloride chitosan nanoparticles for the treatment of general anxiety disorder. *Int J Biol Macromol*. 2015 Nov 1;81:49–59.

190. Salem HF, Ali AA, Rabea YK, Abo El-Ela FI, Khallaf RA. Optimization and Appraisal of Chitosan-Grafted PLGA Nanoparticles for Boosting Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effect of Duloxetine HCl Using Box-Benken Design. *J Pharm Sci*. 2023 Feb;112(2):544–61.

191. Salmon D, Gilbert E, Gioia B, Haftek M, Pivot C, Verrier B, et al. New easy handling and sampling device for bioavailability screening of topical formulations. *Eur J Dermatol EJD*. 2015 Apr;25 Suppl 1:23–9.

192. Fonseca FN, Betti AH, Carvalho FC, Gremião MPD, Dimer FA, Guterres SS, et al. Mucoadhesive Amphiphilic Methacrylic Copolymer-Functionalized Poly(ϵ -caprolactone) Nanocapsules for Nose-to-Brain Delivery of Olanzapine. *J Biomed Nanotechnol*. 2015 Aug;11(8):1472–81.

193. Chamanza R, Wright JA. A Review of the Comparative Anatomy, Histology, Physiology and Pathology of the Nasal Cavity of Rats, Mice, Dogs and Non-human Primates. Relevance to Inhalation Toxicology and Human Health Risk Assessment. *J Comp Pathol*. 2015 Nov;153(4):287–314.

194. Prentice RN, Rizwan SB. Translational Considerations in the Development of Intranasal Treatments for Epilepsy. *Pharmaceutics*. 2023 Jan 10;15(1):233.

195. Regan SL, Williams MT, Vorhees CV. Review of Rodent Models of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 2022 Jan;132:621–37.

196. Gross EA, Swenberg JA, Fields S, Popp JA. Comparative morphometry of the nasal cavity in rats and mice. *J Anat*. 1982 Aug;135(Pt 1):83–8.

197. Clementino A, Batger M, Garrastazu G, Pozzoli M, Del Favero E, Rondelli V, et al. The nasal delivery of nanoencapsulated statins – an approach for brain delivery. *Int J Nanomedicine*. 2016 Dec 7;11:6575–90.

198. Fieux M, Rovera R, Coiffier C, Colomb E, Enjolras N, Béquignon E, et al. In vivo intranasal delivery of coagulation factor IX: a proof-of-concept study. *J Thromb Haemost JTH*. 2023 Nov;21(11):3117–23.

199. Wang L, Xu L, Du J, Zhao X, Liu M, Feng J, et al. Nose-to-brain delivery of borneol modified tanshinone IIA nanoparticles in prevention of cerebral ischemia/reperfusion injury. *Drug Deliv*. 2021 Jun 28;28(1):1363–75.

200. Musumeci T, Serapide MF, Pellitteri R, Dalpiaz A, Ferraro L, Dal Magro R, et al. Oxcarbazepine free or loaded PLGA nanoparticles as effective intranasal approach to control epileptic seizures in rodents. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018 Dec 1;133:309–20.

201. Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002

Apr;282(4):L833-839.

202. Md S, Haque S, Fazil M, Kumar M, Baboota S, Sahni JK, et al. Optimised nanoformulation of bromocriptine for direct nose-to-brain delivery: biodistribution, pharmacokinetic and dopamine estimation by ultra-HPLC/mass spectrometry method. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014 Jun 1;11(6):827–42.
203. Abou-Taleb BA, El-Ganainy SO. Thermoresponsive Gel-loaded Oxcarbazepine Nanosystems for Nose- To-Brain Delivery: Enhanced Antiepileptic Activity in Rats. *Pharm Res*. 2023;40(7):1835–52.
204. Wong CYJ, Baldelli A, Tietz O, van der Hoven J, Suman J, Xin Ong H, et al. An overview of *in vitro* and *in vivo* techniques for characterization of intranasal protein and peptide formulations for brain targeting. *Int J Pharm*. 2024 Feb 22;123922.
205. Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci*. 2010 Apr;99(4):1654–73.
206. Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*. 2004;127(2):481–96.
207. Kublik H, Vidgren MT. Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998 Jan 5;29(1):157–77.
208. Hard SAAA, Shivakumar HN, Redhwan MAM. Development and optimization of in-situ gel containing chitosan nanoparticles for possible nose-to-brain delivery of vinpocetine. *Int J Biol Macromol*. 2023 Dec 31;253:127217.
209. Monge C, Ayad C, Paris AL, Rovera R, Colomb E, Verrier B. Mucosal Adjuvants Delivered by a Mucoadhesive Patch for Sublingual Administration of Subunit Vaccines. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 3;23(21):13440.
210. Shrewsbury SB. The Pharmacokinetics of Drugs Delivered to the Upper Nasal Space. *Pharm Med*. 2023;37(6):451–61.
211. Veronesi MC, Alhamami M, Miedema SB, Yun Y, Ruiz-Cardozo M, Vannier MW. Imaging of intranasal drug delivery to the brain. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2020;10(1):1–31.
212. Sun Y, Zhong X, Dennis AM. Minimizing near-infrared autofluorescence in preclinical imaging with diet and wavelength selection. *J Biomed Opt*. 2023 Sep;28(9):094805.
213. Bi C, Wang A, Chu Y, Liu S, Mu H, Liu W, et al. Intranasal delivery of rotigotine to the brain with lactoferrin-modified PEG-PLGA nanoparticles for Parkinson's disease treatment. *Int J Nanomedicine*. 2016 Dec 7;11:6547–59.
214. Meng Q, Wang A, Hua H, Jiang Y, Wang Y, Mu H, et al. Intranasal delivery of Huperzine A to the brain using lactoferrin-conjugated N-trimethylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for treatment of Alzheimer's disease. *Int J Nanomedicine*. 2018 Feb 1;13:705–18.
215. Li X, Li S, Ma C, Li T, Yang L. Preparation of baicalin-loaded ligand-modified nanoparticles for nose-to-brain delivery for neuroprotection in cerebral ischemia. *Drug Deliv*. 2022 Apr 25;29(1):1282–98.
216. El-Kawy OA, Shweeta HA, Attallah KM. Radioiodination, nasal nanoformulation and preliminary evaluation of isovanillin: A new potential brain cancer-targeting agent. *Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med*. 2022 Nov;189:110464.
217. Nigam K, Kaur A, Tyagi A, Nematullah M, Khan F, Gabrani R, et al. Nose-to-brain delivery of lamotrigine-loaded PLGA nanoparticles. *Drug Deliv Transl Res*. 2019 Oct;9(5):879–90.
218. de Oliveira Junior ER, Nascimento TL, Salomão MA, da Silva ACG, Valadares MC, Lima EM. Increased Nose-to-Brain Delivery of Melatonin Mediated by Polycaprolactone Nanoparticles for the Treatment of Glioblastoma. *Pharm Res*. 2019 Jul 1;36(9):131.
219. Li Y, Wang C, Zong S, Qi J, Dong X, Zhao W, et al. The Trigeminal Pathway Dominates the Nose-to-Brain Transportation of Intact Polymeric Nanoparticles: Evidence from Aggregation-Caused Quenching Probes. *J Biomed Nanotechnol*. 2019 Apr 1;15(4):686–702.
220. Cayero-Otero MD, Gomes MJ, Martins C, Álvarez-Fuentes J, Fernández-Arévalo M, Sarmento B, et al. In vivo biodistribution of venlafaxine-PLGA nanoparticles for brain delivery: plain vs. functionalized nanoparticles. *Expert Opin Drug Deliv*. 2019 Dec;16(12):1413–27.

221. Md S, Khan RA, Mustafa G, Chuttani K, Baboota S, Sahni JK, et al. Bromocriptine loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain delivery: Pharmacodynamic, Pharmacokinetic and Scintigraphy study in mice model. *Eur J Pharm Sci.* 2013 Feb 14;48(3):393–405.
222. Sava V, Fihurka O, Khvorova A, Sanchez-Ramos J. Enriched chitosan nanoparticles loaded with siRNA are effective in lowering Huntington's disease gene expression following intranasal administration. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2020 Feb;24:102119.
223. Jiang Y, Li Y, Liu X. Intranasal delivery: circumventing the iron curtain to treat neurological disorders. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(11):1717–25.
224. Study Details | Study of APH-1105 in Patients With Mild to Moderate Alzheimer's Disease | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2024 Jun 13]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03806478>
225. Ramasubramanian B, Reddy VS, Chellappan V, Ramakrishna S. Emerging Materials, Wearables, and Diagnostic Advancements in Therapeutic Treatment of Brain Diseases. *Biosensors.* 2022 Dec 16;12(12):1176.
226. Sharma S, Lohan S, Murthy RSR. Formulation and characterization of intranasal mucoadhesive nanoparticulates and thermo-reversible gel of levodopa for brain delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* 2014 Jul;40(7):869–78.
227. Jha S, Mishra D. Evaluation of Brain Targeting Potential of Zolmitriptan Mucoadhesive Nanoparticles for Intranasal Drug Delivery. *Pharm Nanotechnol.* 2022;10(2):113–24.
228. Hao R, Sun B, Yang L, Ma C, Li S. RVG29-modified microRNA-loaded nanoparticles improve ischemic brain injury by nasal delivery. *Drug Deliv.* 2020 May 13;27(1):772–81.
229. Di Gioia S, Trapani A, Mandracchia D, De Giglio E, Cometa S, Mangini V, et al. Intranasal delivery of dopamine to the striatum using glycol chitosan/sulfobutylether- β -cyclodextrin based nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Aug 1;94:180–93.
230. Trapani A, Cometa S, De Giglio E, Corbo F, Cassano R, Di Gioia ML, et al. Novel Nanoparticles Based on N,O-Carboxymethyl Chitosan-Dopamine Amide Conjugate for Nose-to-Brain Delivery. *Pharmaceutics.* 2022 Jan 8;14(1):147.
231. Brar V, Kaur G. Preparation of Chitosan Okra Nanoparticles: Optimization and Evaluation as Mucoadhesive Drug Delivery System. *Pharm Nanotechnol.* 2018;6(3):180–91.
232. Hanna DMF, Youshia J, Fahmy SF, George MY. Nose to brain delivery of naringin-loaded chitosan nanoparticles for potential use in oxaliplatin-induced chemobrain in rats: impact on oxidative stress, cGAS/STING and HMGB1/RAGE/TLR2/MYD88 inflammatory axes. *Expert Opin Drug Deliv.* 2023;20(12):1859–73.
233. de Oliveira Junior ER, Santos LCR, Salomão MA, Nascimento TL, de Almeida Ribeiro Oliveira G, Lião LM, et al. Nose-to-brain drug delivery mediated by polymeric nanoparticles: influence of PEG surface coating. *Drug Deliv Transl Res.* 2020 Dec;10(6):1688–99.
234. Gao X, Chen J, Tao W, Zhu J, Zhang Q, Chen H, et al. UEA I-bearing nanoparticles for brain delivery following intranasal administration. *Int J Pharm.* 2007 Aug 1;340(1):207–15.
235. Akel H, Csóka I, Ambrus R, Bocsik A, Gróf I, Mészáros M, et al. In Vitro Comparative Study of Solid Lipid and PLGA Nanoparticles Designed to Facilitate Nose-to-Brain Delivery of Insulin. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 9;22(24):13258.
236. Sharma D, Sharma RK, Bhatnagar A, Nishad DK, Singh T, Gabrani R, et al. Nose to Brain Delivery of Midazolam Loaded PLGA Nanoparticles: In Vitro and In Vivo Investigations. *Curr Drug Deliv.* 2016;13(4):557–64.
237. Abdelbary GA, Tadros MI. Brain targeting of olanzapine via intranasal delivery of core–shell difunctional block copolymer mixed nanomicellar carriers: In vitro characterization, ex vivo estimation of nasal toxicity and in vivo biodistribution studies. *Int J Pharm.* 2013 Aug 16;452(1):300–10.
238. Lamrayah M, Charriaud F, Hu S, Megy S, Terreux R, Verrier B. Molecular modelling of TLR agonist Pam3CSK4 entrapment in PLA nanoparticles as a tool to explain loading efficiency and functionality. *Int J Pharm.* 2019 Sep 10;568:118569.
239. Bekhouche M, Bolon M, Charriaud F, Lamrayah M, Da Costa D, Primard C, et al. Development of an antibacterial nanocomposite hydrogel for human dental pulp engineering. *J Mater Chem B.* 2020

Sep 23;8(36):8422–32.

240. Boisdard AS, Lamrayah M, Dzikowski M, Salmon D, Kirilov P, Primard C, et al. Innovative drug vehicle for local treatment of inflammatory skin diseases: Ex vivo and in vivo screening of five topical formulations containing poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017 Jul 1;116:51–60.
241. Ayad C, Libeau P, Lacroix-Gimon C, Ladavière C, Verrier B. LipoParticles: Lipid-Coated PLA Nanoparticles Enhanced In Vitro mRNA Transfection Compared to Liposomes. *Pharmaceutics.* 2021 Mar 12;13(3):377.
242. Da Costa D, Exbrayat-Héritier C, Rambaud B, Megy S, Terreux R, Verrier B, et al. Surface charge modulation of rifampicin-loaded PLA nanoparticles to improve antibiotic delivery in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Nanobiotechnology.* 2021 Jan 7;19(1):12.
243. Singhvi MS, Zinjarde SS, Gokhale DV. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *J Appl Microbiol.* 2019 Dec;127(6):1612–26.
244. James R, Manoukian OS, Kumbhar SG. Poly(lactic acid) for delivery of bioactive macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Dec 15;107:277–88.
245. Casalini T, Rossi F, Castrovinci A, Perale G. A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 Oct 11;7:259.
246. Ayari-Riabi S, Ben khalaf N, Bouhaouala-Zahar B, Verrier B, Trimaille T, Benlasfar Z, et al. Polylactide Nanoparticles as a Biodegradable Vaccine Adjuvant: A Study on Safety, Protective Immunity and Efficacy against Human Leishmaniasis Caused by *Leishmania Major*. *Molecules.* 2022 Dec 8;27(24):8677.
247. Cortés H, Hernández-Parra H, Bernal-Chávez SA, Prado-Audelo MLD, Caballero-Florán IH, Borbolla-Jiménez FV, et al. Non-Ionic Surfactants for Stabilization of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Uses. *Materials.* 2021 Jun 10;14(12):3197.
248. Escalona-Rayó O, Fuentes-Vázquez P, Leyva-Gómez G, Cisneros B, Villalobos R, Magaña JJ, et al. Nanoparticulate strategies for the treatment of polyglutamine diseases by halting the protein aggregation process. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017 Jun;43(6):871–88.
249. Lamrayah M, Phelip C, Rovera R, Coiffier C, Lazhar N, Bartolomei F, et al. Poloxamers Have Vaccine-Adjuvant Properties by Increasing Dissemination of Particulate Antigen at Distant Lymph Nodes. *Molecules.* 2023 Jun 15;28(12):4778.
250. Zarrintaj P, Ramsey JD, Samadi A, Atoufi Z, Yazdi MK, Ganjali MR, et al. Poloxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2020 Jul 1;110:37–67.
251. Bollenbach L, Buske J, Mäder K, Garidel P. Poloxamer 188 as surfactant in biological formulations – An alternative for polysorbate 20/80? *Int J Pharm.* 2022 May 25;620:121706.
252. Russo E, Villa C. Poloxamer Hydrogels for Biomedical Applications. *Pharmaceutics.* 2019 Dec 10;11(12):671.
253. Gross-Amat O, Guillen M, Salmon D, Nataf S, Auxenfans C. Characterization of a Topically Testable Model of Burn Injury on Human Skin Explants. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 22;21(18):6956.
254. Li R, Li Y, Wu Y, Zhao Y, Chen H, Yuan Y, et al. Heparin-Poloxamer Thermosensitive Hydrogel Loaded with bFGF and NGF Enhances Peripheral Nerve Regeneration in Diabetic Rats. *Biomaterials.* 2018 Jun;168:24–37.
255. Zhao YZ, Jiang X, Lin Q, Xu HL, Huang YD, Lu CT, et al. Thermosensitive heparin-poloxamer hydrogels enhance the effects of GDNF on neuronal circuit remodeling and neuroprotection after spinal cord injury. *J Biomed Mater Res A.* 2017 Oct;105(10):2816–29.
256. Nedelec S, Dubacq C, Trembleau A. Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special? *J Neurocytol.* 2005 Mar;34(1–2):49–64.
257. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Controlled Release.* 2016 Aug 10;235:337–51.
258. Préparations nasales - European Pharmacopoeia 11.8 [Internet]. [cited 2025 Apr 3]. Available from: <https://pheur.edqm.eu/app/11-8/content/default/0676F.htm>
259. Mercier C, Perek N, Delavenne X. Is RPMI 2650 a Suitable In Vitro Nasal Model for Drug

- Transport Studies? *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2018 Feb;43(1):13–24.
260. Horváth T, Bartos C, Bocsik A, Kiss L, Veszélka S, Deli MA, et al. Cytotoxicity of Different Excipients on RPMI 2650 Human Nasal Epithelial Cells. *Molecules.* 2016 May 18;21(5):658.
261. Sibinovska N, Žakelj S, Trontelj J, Kristan K. Applicability of RPMI 2650 and Calu-3 Cell Models for Evaluation of Nasal Formulations. *Pharmaceutics.* 2022 Feb 6;14(2):369.
262. Wiatrak B, Kubis-Kubiak A, Piwowar A, Barg E. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells.* 2020 Apr 14;9(4):958.
263. Xu M, McCanna DJ, Sivak JG. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2015 Jan 1;71:1–7.
264. Benavides F, Oberyszyn TM, VanBuskirk AM, Reeve VE, Kusewitt DF. The hairless mouse in skin research. *J Dermatol Sci.* 2009 Jan;53(1):10–8.
265. Del Rosal B, Villa I, Jaque D, Sanz-Rodríguez F. In vivo autofluorescence in the biological windows: the role of pigmentation. *J Biophotonics.* 2016 Oct;9(10):1059–67.
266. Gandhay D, Pettan-Brewer C, Ladiges W. The CB6F1 mouse is a model for studying cognition and brain morphometry with increasing age. *Aging Pathobiol Ther.* 2023;5(1):36–8.
267. Bryche B, Fréaud M, Saint-Albin Deliot A, Galloux M, Sedano L, Langevin C, et al. Respiratory syncytial virus tropism for olfactory sensory neurons in mice. *J Neurochem.* 2020 Sep;155(2):137–53.
268. Verhaagen J, Oestreicher AB, Gispén WH, Margolis FL. The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1989 Feb;9(2):683–91.
269. Nagayama S, Homma R, Imamura F. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits.* 2014 Sep 3;8:98.
270. Megy S, Agüero S, Da Costa D, Lamayah M, Berthet M, Primard C, et al. Molecular Dynamics Studies of Poly(Lactic Acid) Nanoparticles and Their Interactions with Vitamin E and TLR Agonists Pam1CSK4 and Pam3CSK4. *Nanomater Basel Switz.* 2020 Nov 5;10(11):2209.
271. Rojanaratha T, Tienthai P, Woradulayapinij W, Yimsoo T, Boonkanokwong V, Ritthidej GC. Preparation, physicochemical characterization, *ex vivo*, and *in vivo* evaluations of asiatic acid-loaded solid lipid nanoparticles formulated with natural waxes for nose-to-brain delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2024 Dec 1;203:106935.
272. Srivastava S, Ahmad R, Khare SK. Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: A review. *Eur J Med Chem.* 2021 Apr 15;216:113320.
273. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research.* 2018 Jul 31;7:F1000 Faculty Rev-1161.
274. Ferrari C, Sorbi S. The complexity of Alzheimer's disease: an evolving puzzle. *Physiol Rev.* 2021 Jul 1;101(3):1047–81.
275. Gao Y, Tan L, Yu JT, Tan L. Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Curr Alzheimer Res.* 2018;15(3):283–300.
276. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol.* 2016 Jan;14(1):101–15.
277. VIDAL [Internet]. [cited 2024 Jul 31]. VIDAL, Éclairer vos décisions médicales. Available from: <https://www.vidal.fr/>
278. Lange C, Storkebaum E, de Almodóvar CR, Dewerchin M, Carmeliet P. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nat Rev Neurol.* 2016 Aug;12(8):439–54.
279. Martin L, Bouvet P, Chounlamountri N, Watrin C, Besançon R, Pinatel D, et al. VEGF counteracts amyloid- β -induced synaptic dysfunction. *Cell Rep.* 2021 May 11;35(6):109121.
280. Bouvet P. Un peptide dérivé du VEGF : une nouvelle stratégie pour prévenir la toxicité des oligomères d'Ab dans la maladie d'Alzheimer [Internet] [phdthesis]. Université Claude Bernard - Lyon I; 2022 [cited 2023 Jul 5]. Available from: <https://theses.hal.science/tel-04071937>
281. Pavot V, Rochereau N, Primard C, Genin C, Perouzel E, Lioux T, et al. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J*

Control Release Off J Control Release Soc. 2013 Apr 10;167(1):60–7.

282. Climent N, Munier S, Piqué N, García F, Pavot V, Primard C, et al. Loading dendritic cells with PLA-p24 nanoparticles or MVA expressing HIV genes induces HIV-1-specific T cell responses. *Vaccine*. 2014 Oct 29;32(47):6266–76.

283. Kosel F, Pelley JMS, Franklin TB. Behavioural and psychological symptoms of dementia in mouse models of Alzheimer's disease-related pathology. *Neurosci Biobehav Rev*. 2020 May;112:634–47.

284. Nijssen KMR, Mensink RP, Joris PJ. Effects of Intranasal Insulin Administration on Cerebral Blood Flow and Cognitive Performance in Adults: A Systematic Review of Randomized, Placebo-Controlled Intervention Studies. *Neuroendocrinology*. 2023 Jan 31;113(1):1–13.

285. Bose M, Farias Quipildor G, Ehrlich ME, Salton SR. Intranasal Peptide Therapeutics: A Promising Avenue for Overcoming the Challenges of Traditional CNS Drug Development. *Cells*. 2022 Nov 16;11(22):3629.

286. Rangasamy SB, Corbett GT, Roy A, Modi KK, Bennett DA, Mufson EJ, et al. Intranasal Delivery of NEMO-Binding Domain Peptide Prevents Memory Loss in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis JAD*. 2015 Jul 24;47(2):385–402.

287. Sragovich S, Malishkevich A, Piontkewitz Y, Giladi E, Touloumi O, Lagoudaki R, et al. The autism/neuroprotection-linked ADNP/NAP regulate the excitatory glutamatergic synapse. *Transl Psychiatry*. 2019 Jan 15;9:2.

288. Alkhalifa AE, Al-Ghraiya NF, Odum J, Shunnarah JG, Austin N, Kaddoumi A. Blood–Brain Barrier Breakdown in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Targeted Strategies. *Int J Mol Sci*. 2023 Nov 14;24(22):16288.

289. Zhou X, Shi Q, Zhang X, Gu L, Li J, Quan S, et al. ApoE4-mediated blood-brain barrier damage in Alzheimer's disease: Progress and prospects. *Brain Res Bull*. 2023 Jul 1;199:110670.

290. Indoria S, Singh V, Hsieh MF. Recent advances in theranostic polymeric nanoparticles for cancer treatment: A review. *Int J Pharm*. 2020 May 30;582:119314.

291. Song Y, Zou J, Castellanos EA, Matsuura N, Ronald JA, Shuhendler A, et al. Theranostics - a sure cure for cancer after 100 years? *Theranostics*. 2024 Mar 31;14(6):2464–88.

292. Hosseini SM, Mohammadnejad J, Salamat S, Beiram Zadeh Z, Tanhaei M, Ramakrishna S. Theranostic polymeric nanoparticles as a new approach in cancer therapy and diagnosis: a review. *Mater Today Chem*. 2023 Apr 1;29:101400.

293. Berger M, Bauser M, Frenzel T, Hilger CS, Jost G, Lauria S, et al. Hafnium-Based Contrast Agents for X-ray Computed Tomography. *Inorg Chem*. 2017 May 15;56(10):5757–61.

294. Owens TC, Anton N, Attia MF. CT and X-ray contrast agents: Current clinical challenges and the future of contrast. *Acta Biomater*. 2023 Nov 1;171:19–36.

295. Cheheltani R, Ezzibdeh RM, Chhour P, Pulaparthi K, Kim J, Jurcova M, et al. Tunable, biodegradable gold nanoparticles as contrast agents for computed tomography and photoacoustic imaging. *Biomaterials*. 2016 Sep 1;102:87–97.

296. Zhang P, Darmon A, Marill J, Mohamed Anesary N, Paris S. Radiotherapy-Activated Hafnium Oxide Nanoparticles Produce Abscopal Effect in a Mouse Colorectal Cancer Model. *Int J Nanomedicine*. 2020 May 29;15:3843–50.

297. Zhang P, Marill J, Darmon A, Mohamed Anesary N, Lu B, Paris S. NBTXR3 Radiotherapy-Activated Functionalized Hafnium Oxide Nanoparticles Show Efficient Antitumor Effects Across a Large Panel of Human Cancer Models. *Int J Nanomedicine*. 2021 Apr 12;16:2761–73.

298. McNeill KA. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin*. 2016 Nov;34(4):981–98.

299. van den Bent MJ, Geurts M, French PJ, Smits M, Capper D, Bromberg JEC, et al. Primary brain tumours in adults. *The Lancet*. 2023 Oct 28;402(10412):1564–79.

300. Ghotme KA, Barreto GE, Echeverria V, Gonzalez J, Bustos RH, Sanchez M, et al. Gliomas: New Perspectives in Diagnosis, Treatment and Prognosis. *Curr Top Med Chem*. 2017;17(12):1438–47.

301. Dhakal B, Tomita Y, Drew P, Price T, Maddern G, Smith E, et al. Perhexiline: Old Drug, New Tricks? A Summary of Its Anti-Cancer Effects. *Molecules*. 2023 Apr 21;28(8):3624.

302. Duarte D, Vale N. Antidepressant Drug Sertraline against Human Cancer Cells. *Biomolecules*.

2022 Oct 19;12(10):1513.

303. Das S, Dey KK, Dey G, Pal I, Majumder A, MaitiChoudhury S, et al. Antineoplastic and Apoptotic Potential of Traditional Medicines Thymoquinone and Diosgenin in Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*. 2012 Oct 15;7(10):e46641.
304. Baetke SC, Lammers T, Kiessling F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *Br J Radiol*. 2015 Oct;88(1054):20150207.
305. Luiz MT, Delello Di Filippo L, Tofani LB, de Araújo JTC, Dutra JAP, Marchetti JM, et al. Highlights in targeted nanoparticles as a delivery strategy for glioma treatment. *Int J Pharm*. 2021 Jul 15;604:120758.
306. Hua H, Zhang X, Mu H, Meng Q, Jiang Y, Wang Y, et al. RVG29-modified docetaxel-loaded nanoparticles for brain-targeted glioma therapy. *Int J Pharm*. 2018 May 30;543(1–2):179–89.
307. Raghav M, Gupta V, Awasthi R, Singh A, Kulkarni GT. Nose-to-brain drug delivery: Challenges and progress towards brain targeting in the treatment of neurological disorders. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2023 Sep 1;86:104756.
308. Jeican II, Gheban D, Barbu-Tudoran L, Inişca P, Albu C, Ilieş M, et al. Respiratory Nasal Mucosa in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps versus COVID-19: Histopathology, Electron Microscopy Analysis and Assessing of Tissue Interleukin-33. *J Clin Med*. 2021 Jan;10(18):4110.
309. Hémar A, Olivo JC, Williamson E, Saffrich R, Dotti CG. Dendroaxonal Transcytosis of Transferrin in Cultured Hippocampal and Sympathetic Neurons. *J Neurosci*. 1997 Dec 1;17(23):9026–34.
310. Moos T. Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system. *J Comp Neurol*. 1996 Nov 25;375(4):675–92.
311. Maaz A, Blagbrough IS, De Bank PA. In Vitro Evaluation of Nasal Aerosol Depositions: An Insight for Direct Nose to Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2021 Jul 14;13(7):1079.
312. Boyuklieva R, Zagorchev P, Pilicheva B. Computational, In Vitro, and In Vivo Models for Nose-to-Brain Drug Delivery Studies. *Biomedicines*. 2023 Aug 4;11(8):2198.
313. Gallo RL. Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes. *J Invest Dermatol*. 2017 Jun;137(6):1213–4.
314. Collins LM, Dawes C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J Dent Res*. 1987 Aug;66(8):1300–2.
315. Wellford SA, Moseman EA. Olfactory immunology: the missing piece in airway and CNS defence. *Nat Rev Immunol*. 2024 Jun;24(6):381–98.
316. Kiyono H, Ernst PB. Nasal vaccines for respiratory infections. *Nature*. 2025 May;641(8062):321–30.
317. Dhuyvetter D, Tekle F, Nazarov M, Vreeken RJ, Borghys H, Rombouts F, et al. Direct nose to brain delivery of small molecules: critical analysis of data from a standardized in vivo screening model in rats. *Drug Deliv*. 27(1):1597–607.
318. Almahmoud A, Parekh HS, Paterson BM, Tupally KR, Vegh V. Intranasal delivery of imaging agents to the brain. *Theranostics*. 2024 Aug 19;14(13):5022–101.
319. Biswal BB, Uddin LQ. The history and future of resting-state functional magnetic resonance imaging. *Nature*. 2025 May;641(8065):1121–31.
320. Calabro FJ, Parr AC, Sydnor VJ, Hetherington H, Prasad KM, Ibrahim TS, et al. Leveraging ultra-high field (7T) MRI in psychiatric research. *Neuropsychopharmacology*. 2025 Jan;50(1):85–102.
321. Maréchal L, Dumoncel J, Santos F, Astudillo Encina W, Evteev A, Prevost A, et al. New insights into the variability of upper airway morphology in modern humans. *J Anat*. 2022 Dec 30;242(5):781–95.
322. Som Chaudhury S, Sinha K, Das Mukhopadhyay C. Intranasal route: The green corridor for Alzheimer's disease therapeutics. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2021 Dec 1;66:102791.
323. Tian F, Cai L, Liu C, Sun J. Microfluidic technologies for nanoparticle formation. *Lab Chip*. 2022 Feb 1;22(3):512–29.
324. Chiesa E, Bellotti M, Caimi A, Conti B, Dorati R, Conti M, et al. Development and optimization of microfluidic assisted manufacturing process to produce PLGA nanoparticles. *Int J Pharm*. 2022 Dec

15;629:122368.

325. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JPh, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm.* 1989 Oct 1;55(1):R1–4.

326. Groot RD, Rabone KL. Mesoscopic simulation of cell membrane damage, morphology change and rupture by nonionic surfactants. *Biophys J.* 2001 Aug;81(2):725–36.

327. Scocchi G, Posocco P, Fermeglia M, Pricl S. Polymer-clay nanocomposites: a multiscale molecular modeling approach. *J Phys Chem B.* 2007 Mar 8;111(9):2143–51.

328. Bryche B, St Albin A, Murri S, Lacôte S, Pulido C, Ar Gouilh M, et al. Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Brain Behav Immun.* 2020 Oct;89:579–86.

329. Mallocci M, Blandin S, Hulin P, Dorval P, Nedellec S, Schmid G, et al. Imagerie tri-dimensionnelle d'échantillons par une technique de serial block face imaging amovible. *Rev Fr Histotechnol.* 2020 Oct;32(1):187–97.